

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 novergicus*) Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian infusa daun murbei (*Morus alba*L.) terhadap histologi glomerulus dan tubulus proximal ginjal tikus putih (*Rattus novergicus*) model diabetes mellitus kronik. Perlakuan yang digunakan terdiri perlakuan kontrol negative/ tanpa perlakuan, positif/tikus putih diabetes dan tikus putih diabetes yang diberi perlakuan infusa daun murbei (*Morus alba*L.).

3.2 Variabel Penelitian

3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan faktor yang sengaja diubah atau dimanipulasi oleh peneliti dengan maksud untuk mengetahui perubahan apa yang terjadi (Nurhayati, 2007). Variabel bebas dalam penelitian adalah pemberian infusa daun murbei (*Morus alba*L.) dengan beberapa dosis pada tikus putih model diabetes mellitus.

3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan faktor yang diukur atau diamati sebagai akibat dari manipulasi variabel bebas (Nurhayati, 2007). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah histologi glomerulus yang meliputi piknosis, karioreksis, pelebaran kapsula dan Bowman. Pada histologi tubulus proximal yang meliputi piknosis, karioreksis, pelebaran jarak antar tubulus proksimal tikus putih (*Rattus novergicus*).

3.2.3 Variabel Terkendali / Kontrol

Variabel terkontrol yaitu faktor yang sengaja dikendalikan supaya tidak mempengaruhi variabel bebas maupun variabel terikat (Nurhayati, 2007). Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah jenis tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar, jenis kelamin jantan, berumur 1-2 bulan dengan berat ± 200 gram berjumlah 24 yang diberi makan pellet dan diberi makan dan diberi minum secara ad libitum.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan, Laboratorium Biosistematik dan Laboratorium Optik Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Januari 2013 sampai April 2014.

3.4 Populasi dan Sampel

Hewan coba yang digunakan tikus putih (*Rattus novergicus*), jenis kelamin jantan, umur 1-2 bulan dengan berat badan antara ± 200 g sebanyak 24 ekor.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang pemeliharaan, tempat minum, tempat makan, glucometer (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, panicle perebusan, botol organ, object glass, deck glass, mikrotom, mikroskop.

3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus putih galus wistar, umur dengan berat badan ± 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 penelitian dimulai, terlebih dahulu dipersiapkan hewan coba, yaitu kandang (bak plastik), sekam, tempat makan, minum dan pakan tikus. Setelah itu dilakukan aklimatisasi selama 2 minggu dengan cara ditempatkan pada sebuah kandang kelompok berupa bak plastik. Selama diaklimatisasi tikus diberi makan berupa pellet dan minum ad libitum,. Tujuan aklimatisasi ini adalah untuk menyeragamkan cara hidup dan makanan hewan coba yang digunakan dalam penelitian.

3.6.2 Persiapan Perlakuan

3.6.2.1 Persiapan Bahan Diabetogenik

Bahan diabetogenik yang digunakan dalam penelitian ini yaitu aloksan. Untuk membuat kondisi diabetes mellitus kronik, sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan pada ginjal, 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.

Dosis aloksan = 100 mg/kg BB

Berat tikus = 250 gr = $250/1000$ kg
 = 0,25 kg
 = 0,25 kg x 100 mg aloksan
 = 25 mg

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

25 mg = $25/1000$ gr
 = 0,0025 gr
 = 0,025 gr x 5 ml
 = 0,125 ml

Untuk mengetahui kurun waktu kerusakan ginjal 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 di konversikan ke tikus mencapai 4 minggu sudah mengalami kerusakan pada organ. Apabila sudah komplikasi maka diberi perlakuan infusa daun murbei (*Morus alba*L.).

3.6.2.2 Pembuatan Infusa Daun Murbei

Daun murbei dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dibawah terik matahari selama 5 hari. Tujuan dari pengeringan ini adalah agar menghilangkan zat toksik atau getah pada daun yang segar. Setelah kering, daun murbei dijadikan serbuk dengan derajat kehalusan 5/8 (serbuk sangat kasar), 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. Apabila infusa tersebut belum mencapai 100 ml maka ditambah air panas sebanyak 100 ml (Sunarsih, 2009).

$$\text{BB tikus} = 250 \text{ gr} = 250/1000 = 0,25 \text{ kg}$$

1. Dosis I (400 mg/kg BB) $= 250/1000 \text{ kg} \times 400 \text{ mg BB}$ $= 0,25 \text{ kg} \times 400 \text{ mg}$ $= 100 \text{ mg}/250 \text{ gr}$ Total dosis yang diberikan untuk 4 tikus adalah $100 \text{ mg}/250 \text{ gr} \times 4 \text{ tikus}$ $= 400 \text{ mg/kg BB}$	2. Dosis II (600 mg/kg BB) $= 250/1000 \text{ kg} \times 600 \text{ mg BB}$ $= 0,25 \text{ kg} \times 600 \text{ mg BB}$ $= 150 \text{ mg}/250 \text{ gr}$ Total dosis yang diberikan untuk 4 tikus adalah $150 \text{ mg}/250 \text{ gr} \times 4 \text{ tikus}$ $= 600 \text{ mg/kg BB}$
---	---

3. Dosis III (800 mg/kg BB) $= 250/1000 \times 800$ $= 0,25 \text{ kg} \times 800 \text{ mg}$ $= 200 \text{ mg}/250 \text{ gr}$ Total dosis yang diberikan untuk 4 tikus adalah $200 \text{ mg}/250 \text{ gr} \times 4 \text{ tikus} = 800 \text{ mg/kg BB}$	4. Dosis IV (1000 mg/kg BB) $= 250/1000 \times 1000$ $= 0,25 \text{ kg} \times 1000 \text{ mg}$ $= 250 \text{ mg}/250 \text{ gr}$ Total dosis yang diberikan untuk 4 tikus adalah $250 \text{ mg}/250 \text{ gr} \times 4 \text{ tikus} = 1000 \text{ mg/kg BB}$
---	--

$2,5 \text{ ml} \times 4 \text{ tikus} = 10 \text{ ml}$

$10 \text{ ml} \times 10 \text{ hari} = 100 \text{ ml}$ (infusa murbei dibuat 100 ml per dosis)

Jadi, selama 30 hari membuat 300 ml setiap perlakuan.

3.6.3 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Sebelum perlakuan pemberian infusa daun murbei, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah pada awal, sebelum dilakukan pengukuran kadar glukosa darah, tikus dipuaskan selama 16 jam. Selama di puasakan sekam dikeluarkan agar tidak dimakan oleh tikus. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan cara mengambil darah mencit melalui ekor yang terlebih dahulu dibersihkan dengan alcohol. Kemudian darah diteteskan pada strip glucometer lalu dimasukkan ke dalam dan dibaca kadar glukosanya. Menurut kriteria Perkeni (2006), seseorang terkena diabetes jika kadar glukosa darahnya $\geq 200 \text{ mg/dl}$ dan jika puasa yaitu $\geq 126 \text{ mg/dl}$.

3.6.4 Pembagian Kelompok Sampel

Setelah diinduksi dengan aloksan, maka tikus dibagi menjadi enam kelompok dengan masing-masing empat kelompok. 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.

3.7 Kegiatan Penelitian

3.7.1 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 2,5 ml (merupakan volume gastrik tikus). Pada akhir penelitian tikus dibedah untuk isolasi ginjal untuk penimbangan dan pembuatan preparat histologis.

3.7.2 Pembuatan Preparat Histologis

1. Tahap pertama adalah coating. Dimulai dengan menandai objek glass yang akan digunakan dengan kikir kaca pada area tepi lalu direndam dalam alkohol 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 yaitu organ yang telah disimpan dalam larutan formalin 10% dicuci dengan alkohol selama 2 jam. Dilanjutkan dengan pencucian secara bertingkat dengan alkohol yaitu 90%, 95%, etanol absolute (3 kali), xylol (3 kali) masing-masing selama 20 menit.
3. Tahap ketiga adalah proses *infiltrasi* yaitu dengan menambahkan paraffin 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 paraffin dibiarkan semalam dalam suhu ruang kemudian diinkubasi dalam freezer sehingga blok benar-benar keras.
5. Tahap kelima adalah pemotongan dengan mikrotom. Pertama, cutter dipanaskan dan ditempelkan pada dasar blok sehingga paraffin sedikit meleleh. Kemudian holder dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata sejajar dengan mata pisau mikrotom. Pengirisan atau penyayatan diawali

dengan mengatur ketebalan irisan. Untuk ginjal dipotong dengan ukuran 5µm. 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 di coating lalu dikeringkan diatas hot plate.

6. Tahap deparafinasi, yakni preparat dimasukkan dalam xylol sebanyak dua kali setiap lima 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 *hematoxylen* 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 alkohol selama 30 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit.
9. Tahap berikutnya adalah *dehidrasi* dengan memasukkan preparat pada seri ethanol bertingkat dari 80%, 90% dan 95% hingga ethanol absolute (2 kali) masing-masing selama 5 menit.
10. Tahap *clearing* dilakukan dengan memasukkan preparat pada xylol dua kali selama lima menit dan dikeringkan.
11. Selanjutnya dilakukan *mounting* dengan entellan.

12. Hasilakhir diamati dibawah mikroskop, dipotret dan kemudian dicatat data skor kerusakan pada organ.

3.8 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian infusa daun murbei (*Morus alba* L.) terhadap gambaran histologi glomerulus dan tubulus proksimal tikus putih (*Rattus norvegicus*), dilakukan melalui perhitungan tingkat kerusakan organ dengan 5 lapang pandang dalam setiap preparat.

Tabel 3.1 Acuan penilaian atau skoring pada masing-masing organ yang diamati secara histologis (Mufarrichah, 2011):

Skor	Glomerulus	TubulusProksimal
1	Tidakterdapatkerusakan	Tidakterdapatkerusakan
1,5	Kerusakanpadatahappiknosismencapai $\leq \frac{1}{2}$ luaslapangpandang. (ditandai dengan sel mengerut dan berwarna hitam)	Kerusakan pada tahap piknosis mencapai $\leq \frac{1}{2}$ luas lapang pandang. (ditandai dengan sel mengerut dan berwarna hitam)
2	Kerusakan pada tahap piknosis $\geq \frac{1}{2}$ luas lapang pandang	Kerusakan pada tahap piknosis $\geq \frac{1}{2}$ luas lapang pandang
2,5	Kerusakan padatahapkarioreksis $\leq \frac{1}{2}$ luaslapangpandang. (ditandai dengan sel robek dan hancur)	Kerusakanpadatahapkarioreksis $\leq \frac{1}{2}$ luaslapangpandang (ditandai dengan sel robek dan hancur)
3	Kerusakanpadatahapkarioreksis $\geq \frac{1}{2}$ luaslapangpandang	Kerusakanpadatahapkarioreksis $\geq \frac{1}{2}$ luaslapangpandang

3,5	Penurunan jumlah sel yang ditandai dengan adanya pelebaran jarak antara glomerulus dan kapsul bowman. (diukur yang paling luas perluasannya antara glomerulus dan kapsula bowman dimuai dari tepi glomerulus sampai tepi kapsula bowman)	Penurunan jumlah sel yang ditandai dengan pelebaran jarak antar sel. (diukur jarak antara kedua tubulus proksimal dan dipilih yang paling luas perluasannya, dimuai dari tepi tubulus proksimal sampai tepi tubulus proksimal lainnya).
-----	--	---

Kemudian dari 5 lapang pandang setiap preparat dijumlah skoringnya dan dianalisis dengan uji ANOVA satu arah. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji Duncan dengan taraf signifikansi 1%.

Gambaran histologi ditentukan dengan pengamatan dibawah mikroskop dan diamati kerusakan sel pada organ. Pengamatan ini dilakukan dengan menggunakan perbesaran 400x.