

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap kadar glukosa darah dan histologi pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi oleh aloksan ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan 3 ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah tikus kontrol negatif (tanpa perlakuan), tikus kontrol positif (diabetes tanpa pemberian ekstrak daun sirsak) dan tikus diabetes yang diberi ekstrak daun sirsak dengan 3 dosis yang berbeda.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juni sampai Desember 2014, di Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.3 Variabel Penelitian**

Variabel pada penelitian ini meliputi:

- a. Variabel bebas : ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan dosis yang berbeda 0, 50, 100 dan 150 mg/kg BB.
- b. Variabel terikat : variabel yang diukur adalah kadar glukosa darah dan histologi pankreas.

- c. Variabel kendali: jenis tikus yang digunakan adalah tikus putih jantan putih galur wistar (*Rattus norvegicus*) berumur 2 bulan dengan berat badan rata-rata 200 g dan dikondisikan menjadi diabetes dengan diinduksi aloksan 120 mg/kg BB.

### **3.4 Populasi dan Sampel**

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*) jenis kelamin jantan, umur 2 bulan dengan berat badan rata-rata 200 gram sebanyak 15 ekor.

### **3.5 Alat dan Bahan**

#### **3.5.1 Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang hewan coba (bak plastik), alat pencekok oral (*gavage*), gelas ukur, timbangan digital, gelas arloji, spatula spuit, seperangkat alat bedah, blender, glukometer, strip glukotest, rotary evaporator, oven, *obyek glass*, *freezer*, mikrotom, *hot plate*.

#### **3.5.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*), ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.), aquades, aloksan dengan kadar 120 mg/kg berat badan, NaCL 0,9%, kapas, alkohol 70%, gelatin, formalin, etanol absolut, xylol, tissue, parafin, etilen, dan eosin.

## **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 tikus. Setelah itu dilakukan aklimatisasi di laboratorium selama 1 minggu. Mencit dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif tikus normal (tidak diabetes), kelompok tikus kontrol positif (diabetes) dan kelompok diabetes diobati daun sirsak (*Annona muricata* L.). Untuk menjadi diabetes, tikus diinduksi dengan aloksan dengan 120 mg/kg BB diinjeksikan 3 kali seminggu melalui intraperitoneal.

### **3.6.2 Pembuatan Perlakuan**

#### **3.6.2.1 Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak**

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) 1 kg yang masih segar dikeringkan, kemudian ditumbuk di mortar atau dimasukkan ke dalam blender. Bubuk halus dicampur dengan aquades dan diekstraksi 2 kali dengan 2,5 liter aquades pada suhu kamar selama 48 jam. Kemudian dihasilkan ekstrak daun sirsak sebanyak 36,23 g. Selanjutnya diberikan kepada hewan coba untuk perlakuan (Adewole, 2009).

#### **3.6.2.2 Pengukuran Kadar Glukosa Darah**

Sebelum perlakuan pemberian ekstrak daun sirsak, dilakukan pengukuran glukosa darah untuk memastikan bahwa 9 tikus telah mengidap diabetes. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan cara mengambil darah tikus

melalui ekor yang terlebih dahulu dibersihkan dengan alkohol. Kemudian ditetaskan pada strip glukometer lalu dimasukkan ke dalam glukometer dan di baca kadar glukosanya. Tikus menunjukkan kadar glukosa darah hiperglikemi yaitu dengan kadar  $\geq 300$  mg/dL (Wulandari, 2013). Akan tetapi, ketika tidak diabetes maka yang dilakukan yaitu diinjeksi aloksan sampai tikus tersebut diabetes.

### 3.6.2.3 Penentuan Dosis Ekstrak Daun Sirsak

Penentuan dosis ekstrak daun sirsak pada perlakuan dengan hasil modifikasi penelitian Adewole (2009), yaitu 3 dosis yang berbeda 50, 100 dan 150 mg/kgbb. Jika dosis tersebut diberikan pada tikus dengan berat badan rata-rata 200 g, maka dosis ekstrak daun sirsak dapat dihitung menjadi  $(200/1000) \times 150$  ml = 30 ml/ekor,  $(200/1000) \times 100 = 20$  ml/ekor dan  $(200/1000) \times 50$  ml = 10 ml/ekor. Malole (1989), ekstrak yang dapat dimasukkan pada lambung tikus adalah 2,5 ml.

Diperoleh 3 konsentrasi yang berbeda:

1. Konsentrasi I :  $12 \text{ mg/ml} \times 2,5 \text{ ml} = 30 \text{ mg/ekor}$
2. Konsentrasi II :  $8 \text{ mg/ml} \times 2,5 \text{ ml} = 20 \text{ mg/ekor}$
3. Konsentrasi III :  $4 \text{ mg/ml} \times 2,5 \text{ ml} = 10 \text{ mg/ekor}$

### 3.6.2.4 Pembagian Kelompok Sampel

Setelah 9 tikus positif diabetes, tikus dibagi menjadi 5 kelompok, yang terdiri dari:

- a. K- (Kontrol negatif) : Tikus normal tanpa diberi ekstrak daun sirsak dan tanpa diinduksi aloksan untuk diabetes.
- b. K+ (Kontrol positif) : Tikus diabetes dengan induksi aloksan 120 mg/kg BB tanpa diberi ekstrak daun sirsak.
- c. S1 (Sirsak 1) : Tikus diabetes dengan diinduksi aloksan 120 mg/kg BB dan diberi ekstrak daun sirsak dosis I 50 mg/kg BB selama 30 hari.
- d. S2 (Sirsak 2) : Tikus diabetes dengan diinduksi aloksan 120 mg/kg BB dan diberi ekstrak daun sirsak dosis II 100 mg/kg selama 30 hari.
- e. S3 (Sirsak 3) : Tikus diabetes dengan diinduksi aloksan 120 mg/kg BB dan diberi ekstrak daun sirsak dosis III 150 mg/kg selama 30 hari.

### 3.6.3 Kegiatan Penelitian

#### 3.6.3.1 Perlakuan Pemberian Ekstrak daun sirsak

Daun sirsak yang sudah kering dihaluskan dengan mortar atau dimasukkan blender sampai menjadi serbuk. Kemudian dicampur dengan aquades dengan volume yang telah ditentukan. Ekstrak daun sirsak diberikan pada kelompok I, II dan III selama 30 hari dengan dosis yang telah ditentukan.

### 3.6.3.2 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan sebelum dan sesudah pemberian ekstrak daun sirsak. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan menggunakan glukometer dengan prosedur sebagai berikut:

- a. Persiapan glukometer, strip untuk mengukur
- b. Pengambilan sampel dengan cara mengambil darah tikus, melalui ekor terlebih dahulu dibersihkan dengan alkohol. Kemudian diteteskan pada strip glucometer kemudian dimasukkan ke dalam glucometer dan dibaca kadar glukosa. Hasil perhitungan kadar glukosa darah yang terbaca pada glukometer dicatat sebagai data.

### 3.6.3.3 Pembuatan Sayatan Pankreas

Tahap-tahap pembuatan sayatan pankreas (Dewi, 2013):

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 selam 2 jam, dan dilanjutkan dengan pencucian secara bertingkat dengan alkohol yaitu dengan alkohol 90%,

95%, etanol absolut (3 kali), xylol (3 kali), masing-masing selama 20 menit

3. Tahap ketiga, adalah proses *infiltrasi* yaitu dengan menambahkan parafin 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 pankreas dipotong dengan ukuran 2-5  $\mu\text{m}$ , 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 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* selama 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 selama 30 menit dan dibilas dengan aquadest selama 5 menit.
9. Tahap dehidrasi, preparat direndam dalam etanol bertingkat 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. Hasil akhir yaitu histologi pankreas yang berupa sel pankreas diamati dibawah mikroskop dan dipotret kemudian dihitung dengan menggunakan counter serta dicatat data jumlah sel pankreas

### 3.7 Analisis Data

Data kadar glukosa darah tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah diperoleh dianalisis menggunakan uji statistik ANKOVA dan jumlah sel normal dan abnormal pankreas tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah diperoleh dianalisis menggunakan uji statistik ANAVA dengan taraf signifikan 5%.