

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental 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 berat testis dan histologi testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus kronik. Perlakuan yang digunakan terdiri dari perlakuan kontrol negatif/ tanpa perlakuan, kontrol positif / di induksi aloksan tanpa di beri infusa daun murbei, dan tikus putih diabetes yang diberi perlakuan infusa daun murbei (*Morus alba* L.) dengan dosis perlakuan 400 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, 800 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB.

#### **3.2 Variabel Penelitian**

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel bebas : Infusa daun murbei (*Morus alba* L.) dengan dosis 400 mg/Kg BB tikus, 600 mg/Kg BB tikus, 800 mg/Kg BB tikus, dan 1000 mg/ Kg BB tikus.
2. Variabel terikat : Jumlah sel spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid, sel sertoli, diameter tubulus seminiferous, dan berat testis

3. Variabel kontrol : Jenis hewan uji coba yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jenis kelamin jantan, umur, berat badan dan pakan tikus 10 g per hari.

### 3.3 Waktu dan Tempat 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 2014 sampai Juni 2014.

### 3.4 Populasi dan Sampel

Hewan coba yang digunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*), jenis kelamin jantan, umur 2 bulan dengan berat badan antara 70-100 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, glucometer, sonde lambung, timbangan analitik, disposable syringe 1 ml, gelas ukur 100 ml, erlenmeyer 50 ml, kertas saring, sarung tangan, papan sesi, alat bedah, 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 1 bulan dengan berat badan 70-100 g, aloksan, kapas, NaCl fisiologis, daun murbei (*Morus alba* L.), aquabidest 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 untuk menyeragamkan cara hidup dan makanan hewan coba yang digunakan dalam penelitian dengan cara ditempatkan pada sebuah kandang berupa bak plastik. Selama diaklimatisasi tikus diberi makan berupa pellet sebanyak 10g / tikus dan diberi minum secara ad libitum.

#### 3.6.2 Persiapan Bahan Diabetogenik

Bahan diabetogenik yang digunakan untuk membuat kondisi diabetes mellitus pada tikus putih dalam penelitian ini yaitu aloksan, sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan pada testis. Tikus terlebih dahulu diinjeksi aloksan dengan dosis 100 mg/kg BB secara intravena sebanyak 3 kali induksi dan telah dipuasakan selama 24 jam. Sebelum diinjeksikan, aloksan dilarutkan dalam aquabidest dan dihomogenkan dengan menggunakan stirrer.

Dosis = 100 mg/kg BB

Berat tikus = 250 gr = 250/1000 kg

= 0,25 kg

= 0,25 kg x 100 mg

= 25 mg

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

$$25 \text{ mg} = 25/1000 \text{ g}$$

$$= 0,025 \text{ g}$$

$$= 0,025 \text{ g} \times 5 \text{ ml}$$

$$= 0,125 \text{ ml}$$

Komplikasi kronik terjadi akibat glukosa darah yang terus-menerus tinggi dalam jangka waktu lama, sehingga menyebabkan terjadinya gangguan aliran darah, yang dapat menyebabkan komplikasi ke berbagai organ. Untuk mengetahui kurun waktu kerusakan testis tikus dilakukan konversi usia manusia ke usia tikus, menurut Ames *et al.* (2002) kurun waktu 75-80 tahun pada manusia sama dengan 7-10 bulan kurun waktu tikus. Menurut Fioretto (2007) penyakit diabetes mellitus yang diderita selama 5-10 tahun dapat menyebabkan komplikasi pada berbagai organ karena terjadi kerusakan mikrovaskular. Sehingga jika dikonversi ke tikus maka usia tikus diperkirakan sudah mengalami kerusakan mikrovaskular dan mengakibatkan kerusakan testis adalah 1 bulan. Oleh karena itu tikus setelah diinduksi aloksan, dibiarkan selama 4 minggu kemudian baru diberi perlakuan infusa daun murbei (*Morus alba* L.).

### 3.6.3 Pengukuran Glukosa Darah

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan pada awal injeksi aloksan dan sesudah diinjeksi aloksan. Tikus dipuasakan selama 16 jam terlebih dahulu sebelum diukur glukosa darahnya. Pengukuran kadar glukosa darah menggunakan alat yaitu glukotest, darah yang diukur adalah darah dari pembuluh darah ekor tikus. Menurut

kriteria Perkeni (2006), seseorang terkena diabetes jika kadar glukosa darah sewaktu  $\geq 200$  mg/dl dan jika puasa yaitu  $\geq 126$  mg/dl.

#### 3.6.4 Pembuatan Infusa Daun Murbei

Pembuatan infusa daun murbei dilakukan dengan cara daun murbei yang akan digunakan 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 konsentrasi yang dibutuhkan dan ditambah 100 ml aquadest dan dimasak selama 15 menit hingga suhu mencapai  $90^{\circ}\text{C}$ , kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan ditambah air panas secukupnya dalam ampas lalu disaring kembali sampai diperoleh volume infusa sebanyak 100 ml (Sunarsih dkk, 2009).

Berikut perhitungan dosis infusa daun murbei :

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

$$\text{Dosis I} = 400 \text{ mg/kg BB} \qquad \text{Dosis II} = 600 \text{ mg/kg BB}$$

$$\begin{aligned}\text{Dosis I} &= 0,25 \text{ kg} \times 400 \text{ mg} & \text{Dosis II} &= 0,25 \text{ kg} \times 600 \text{ mg} \\ &= 100 \text{ mg/ 250 g BB} & &= 150 \text{ mg/250 g BB}\end{aligned}$$

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.

Dosis III = 800 mg/kg BB

Dosis IV = 100 mg/kg BB

Dosis III = 0,25 kg x 800 mg

Dosis IV = 0,25kg x 1000 mg

= 200 mg/250 gr BB

= 250 mg/250 gr BB

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

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

800 mg.

adalah 1000 mg

1 tikus = 2,5 ml infusa daun murbei

= 2,5 ml x 4 tikus

= 10 ml

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

### 3.6.5 Pembagian Kelompok

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.

### **3.6.6 Pemberian Perlakuan**

Infusa daun murbei (*Morus alba* L.) diberikan selama 4 minggu setelah tikus diinduksi aloksan. 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 dan diambil organ testis untuk penimbangan dan pembuatan preparat histologis.

### **3.6.7 Penimbangan Berat Testis**

1. Diambil testis dari tikus yang telah dibedah dan dibersihkan dari lemak.
2. Dilakukan penimbangan dengan menggunakan timbangan digital.
3. Dicatat dan diambil rata-rata berat testis/ berat badan tikus masing-masing perlakuan.
4. Testis yang tersisa dan telah selesai ditimbang direndam dalam formalin untuk proses pembuatan preparat  $\pm$  9 jam.

### **3.6.8 Pembuatan Preparat Histologi Testis**

1. Tahap pertama *Coating*, dimulai dengan menandai obyek glass yang akan digunakan dengan kikir kaca pada area tepi lalu direndam dalam alkohol 70 % minimal semalam, kemudian obyek 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, organ testis yang sebelumnya telah disimpan dalam larutan formalin diambil.
3. Tahap ketiga adalah *embedding* bahan beserta parafin disiapkan dan diatur pada cetakan sehingga tidak ada udara yang terperangkap.
4. Tahap keempat adalah proses *infiltrasi* yaitu dengan menambahkan parafin 3 kali selama 15 menit. Cetakan parafin disimpan selama semalam dalam suhu ruang kemudian diinkubasi dalam freezer sehingga benar-benar keras.
5. Tahap pemotongan dengan mikrotom. Cutter pasang pada tempatnya. Holder dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata sejajar dengan pisau mikrotom. Pengirisan atau penyayatan dimulai dengan mengatur ketebalan, untuk testis dipotong dengan ukuran 5  $\mu\text{m}$  kemudian pita hasil irisan diambil dengan menggunakan kuas dimasukkan ke dalam air dingin untuk membuka lipatan kemudian masukkan dalam air hangat dan dilakukan pemilihan irisan yang terbaik. Irisan yang terpilih diambil dengan obyek glass yang sudah dicoating lalu dikeringkan diatas hot plate.
6. Tahap *deparanisasi* yakni preparat dimasukkan dengan larutan dalam xylol sebanyak 2 kali selama 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 selama 5 menit. Kemudian preparat direndam dalam aquades selama 10 menit.



8. Tahap pewarnaan HE, preparat ditetesi dengan hematoxilin selama 3 menit atau sampai didapatkan hasil warna yang terbaik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit.
9. Tahap dehidrasi, preparat direndam dengan etanol 80%, 90% dan 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. Mounting dengan entelan hasil akhir akan diamati dengan mikroskop dan dipotret kemudian data dicatat.
12. Pemotretan preparat dalam pengamatan di mikroskop disajikan secara jelas.

#### **3.6.9 Perhitungan Jumlah Sel Sertoli, Sel Spermatogonium, Sel Spermatosit Primer, Sel Spermatosit Sekunder, dan Sel Spermatid**

1. Perhitungan jumlah sel dilakukan dengan cara pengamatan hasil foto dengan mikroskop komputer.
2. Diambil data dari 3 buah tubulus seminiferus dengan 5 bidang pandang yang berukuran hampir sama besar dan di hitung masing-masing jumlah sel spermatogonium, sel spermatosit primer, spermatosit sekunder, sel spermatid, dan sel sertoli.

#### **3.6.10 Perhitungan Diameter Tubulus Seminiferus**

Pengukuran diameter dilakukan pada 3 tubulus seminiferus yang berukuran hampir sama besar dengan cara mengukur jarak terpanjang dan jarak terpendek dari tubulus seminiferus yang bentuknya bulat atau dianggap bulat kemudian dirata-ratakan, kemudian data diolah secara statistik.

### 3.7 Analisis Data

Analisis yang digunakan adalah ANOVA *One Way*. Apabila dari hasil analisis diperoleh nilai  $F$  hitung  $> F$  tabel 1% dilanjutkan dengan uji Duncan dengan  $\alpha$  1%.

