

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak buah jambu biji (*Psidium guajava* L) terhadap kadar gula darah dan gambaran histologi pankreas pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah tikus kontrol (tanpa perlakuan), tikus kontrol positif (diabetes tanpa pemberian ekstrak jambu biji), dan tikus diabetes yang diberi ekstrak buah jambu biji dengan 3 dosis yang berbeda.

3.2 Variabel Penelitian

Variable pada penelitian ini meliputi:

1. Variabel bebas : Buah jambu biji (*Psidium guajava* L) dengan dosis yang berbeda.
2. Variabel terikat : Variabel kadar glukosa darah dan gambaran histologi pankreas tikus.
3. Variable kendali : Tikus jantan galur Strain wistar umur 2 bulan dengan berat badan rata-rata 150-200 gr dan dikondisikan menjadi diabetes dengan cara diinduksi dengan aloksan.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, pada bulan Mei sampai Juli 2010.

3.4 Populasi dan Sampel

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Strain Wistar jenis kelamin jantan, umur 2 bulan dengan berat rata-rata 150-200 gr sebanyak 25 ekor.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu Kandang hewan coba (bak plastik), kawat, tempat pakan, tempat minum tikus, glukometer, Strip glukotest, Objek glass, Deck glass, Timbangan digital, Ayakan tepung, Erlenmeyer 50 ml, Gelas ukur, Beacker glass, Kaca pengaduk.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu hewan coba berupa tikus putih (*Rattus Norvegitus* L) galur Strain wistar kelamin jantan, berat badan rata-rata 200 gr, aloksan dengan kadar 150 mg/kg, Buah jambu biji (*Psidium guajava* L), Pakan tikus, Serbuk kayu, Buffer sitrat pH=4,5, Air PAM, Formalin 10%, Etanol (50%, 70%, 75%, 80%, 90%, 96%), Xylene, Xilol, Alkohol 70%.

3.6 Kegiatan Penelitian

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus diaklimasi di laboratorium selama 1 minggu kemudian dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol tikus normal (tidak diabetes) dan kelompok tikus diabetes. Untuk menjadi diabetes, tikus diinduksi dengan aloksan monohidrat secara intravena dengan dosis tunggal (150 mg/kg bb). Setelah 48 jam tikus dipuasakan selama 18 jam, kemudian diperiksa kadar glukosa darahnya dan tikus yang menjadi diabetes dibagi menjadi 4 kelompok.

Pembuatan larutan aloksan monohidrat dilakukan sesaat sebelum injeksi yaitu dengan melarutkan 540 mg aloksan dalam 100 ml NaCl fisiologis sampai homogen. Kemudian masing-masing tikus di injeksi sebanyak 1 ml aloksan secara intravena.

3.6.2 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak buah jambu biji (*Psidium guajava* L) dilakukan melalui tahapan sebagai berikut:

- a. Disiapkan buah jambu biji
- b. Dicuci buah jambu biji dengan air mengalir
- c. Dilakukan pengirisan buah jambu biji sampai menghasilkan potongan-potongan tipis.
- d. Dilakukan pengeringan dengan cara dimasukkan ke dalam oven.
- e. Buah jambu biji yang sudah kering kemudian diblender
- f. Buah jambu biji yang telah halus, dimaserasi dengan pelarut etanol 96% sampai residu berubah menjadi bening, sambil sesekali diaduk. Daya pelarut

pada etanol 96% lebih tinggi jadi bahan aktif pada buah jambu biji bisa larut dalam pelarut tersebut.

- g. Ekstrak yang dihasilkan disaring dengan corong bunchner
- h. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental. Menggunakan suhu 60°C agar kandungan yang terdapat didalam buah jambu biji tidak hilang.

3.6.3 Penghitungan Dosis Jambu Biji

Untuk mengetahui dosis buah jambu biji dengan cara mengkonversikan dosis manusia ke tikus, menurut Burhan (2008) bahwa kebutuhan akan buah jambu biji per hari adalah sebanyak 90 gram. Kusumawati (2004), menyatakan bahwa faktor konversi dari manusia ke tikus dengan berat badan untuk manusia 70 kg dan berat badan tikus 200 gr adalah 0,018. Jadi $90 \text{ gr} \times 0,018 = 1,62 \text{ gr}$.

Pada penelitian ini menggunakan tiga dosis, yaitu dengan menaikkan dosis efektif dengan menggunakan deret hitung, maka diperoleh tiga dosis di bawah ini:

- a. Dosis I = 0,81 gr/hari/ekor
- b. Dosis II = 1,62 gr/hari/ekor
- c. Dosis II = 3,24 gr/hari/ekor

3.6.4 Prosedur Perlakuan

3.6.4.1 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Sebelum perlakuan pemberian ekstrak buah jambu biji (*Psidium guajava* L), dilakukan pengukuran kadar glukosa darah sebelum perlakuan. Pengukuran kadar darah dilakukan menggunakan glukometer dengan prosedur sebagai berikut:

- a. Persiapan glukometer, strip dipersiapkan untuk mengukur.
- b. Pengambilan sampel darah, tikus diletakkan pada sungkup, ekor tikus dipegang, diurut, dan diberi alkohol. Kemudian ujung ekor dipotong, darah diambil dan diteteskan pada *strip glukotest*.
- c. Hasil penghitungan kadar glukosa darah yang terbaca pada glukometer dicatat sebagai data.

Pemberian ekstrak buah jambu biji untuk perlakuan, ditimbang 500 mg Carboxyl Methyl Cellulose (CMC) Na kemudian ditaburkan pada akuades panas, diaduk sampai CMC Na mengembang, setelah itu ditimbang 0,81 gr ekstrak buah jambu biji dan diaduk sampai homogen. Kemudian, ditambah dengan akuades sampai volumenya 100 ml sedangkan untuk sediaan kelompok kontrol negatif dan positif hanya diberi suspensi Na CMC 0,5% tanpa ekstrak buah jambu biji. Ekstrak buah jambu biji diberikan pada mencit perlakuan setiap hari sesuai dengan dosis I, II, III selama 30 hari. Kadar glukosa darah sesudah perlakuan diukur hari ke-1 dan ke-30 setelah perlakuan. Prosedur pengukuran kadar glukosa darah sama seperti yang dijelaskan diatas. Pengukuran glukosa darah diamati pada akhir penelitian hari ke-30.

3.6.4.2 Pembagian Kelompok Sampel

Setelah 25 mencit positif diabet, mencit dibagi menjadi lima kelompok, yang terdiri dari:

- a. Kelompok kontrol negatif : tikus normal tanpa diberi ekstrak buah jambu biji dan induksi aloksan
- b. Kelompok kontrol positif : tikus diabetes dengan induksi aloksan tanpa

- diberi ekstrak buah jambu biji
- c. Kelompok I : tikus diabetes, dan diberi ekstrak buah jambu biji dosis I selama 30 hari
- d. Kelompok II : tikus diabetes, dan diberi ekstrak buah jambu biji dosis II selama 30 hari
- e. Kelompok III : tikus diabetes, dan diberi ekstrak buah jambu biji dosis III selama 30 hari

3.6.4.3 Pembuatan Preparat Sayatan Pankreas

1. Tahap pertama adalah *coating*, dimulai dengan menandai *obyek gicss* 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 selama 2 jam, dan dilanjutkan dengan pencucian secara bertingkat secara bertingkat dengan alcohol yaitu dengan alkohol 90%, 95%, etanol absolute (3 kali), xylol (3 kali), masing-masing selama 20 menit.
3. Tahap ketiga, adalah proses infiltrasi yaitu dengan menambahkan paraffin sebanyak 3 kali selama 30 menit.
4. Tahap keempat, *embedding*. Bahan beserta paraffin dituangkan kedalam kotak karton atau wadah yang telah disiapkan dan diatur sehingga tidak ada udara yang terperangkap didekat bahan. Blok paraffin dibiarkan semalam

dalam suhu ruang kemudian diinkubasi dalam *frezer* sehingga blok benar-benar keras.

5. Tahap pemotongan dengan mikrotom. Cutter dipanaskan dan ditempelkan pada dasar blok sehingga paraffin 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 μm , 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 absolute (2 kali), etanol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing 5 menit. Kemudian opreparat direndam dalam aquades 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 aquades selama 5 menit. Setelah itu preparat dimasukkkkan dalam pewarna eosin alkohol selama 30 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit.
9. Tahap dehidrasi, preparat direndam dalam etanol bertingkat 80%, 90%, 95% dan etanol absolute (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.
12. Tahap akhir diamati dibawah mikroskop, untuk setiap ekor tikus, satu preparat dengan tiga bidang pandang pengamatan, dipotret kemudian dicatat data skor kerusakan islet pankreas.

3.7 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak buah jambu biji (*Psidium guajava* L) terhadap kadar glukosa darah tikus yang diinduksi aloksan, data hasil pengamatan kemudian diuji statistik dengan menggunakan ANKOVA (*Analysis Of Covariance*). Apabila terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan pengujian BNT 1%. Untuk mengetahui derajat insulitis dilakukan melalui penghitungan kerusakan pulau Langerhans pada tiga luas bidang pandang setiap satu ekor tikus. Perhitungan ini dilakukan dengan cara memprosentase jumlah kerusakan dengan menggunakan millimeter block dan data yang didapat kemudian dianalisis menggunakan One-Way ANOVA. Jika hasil yang diperoleh terdapat perbedaan maka akan dilanjutkan dengan uji BNT 1% untuk mengetahui perbedaan nekrosis pankreas tikus dari tiap kelompok perlakuan. Cara menghitung persentase kerusakan pankreas:

$$x = \frac{\text{jumlah kerusakan}}{\text{luas P.Langerhans}} \times 100\%$$

diabet jika kadar glukosa darahnya lebih dari 135 mg/dl. Hewan coba yang diperlakukan adalah yang telah mencapai kondisi patologis diabetes dengan kadar glukosa darah diatas 135 mg/dl.

Diabetes mellitus diindikasikan dengan tingginya kadar glukosa dalam darah. Pengaturan kadar glukosa dalam darah berkaitan erat dengan jumlah insulin dan sensitifitas reseptor insulin. Rendahnya produksi insulin mengakibatkan terganggunya keseimbangan glukosa dalam tubuh. Insulin meningkatkan penyimpanan lemak maupun glukosa sebagai sumber energi didalam sel target serta mempengaruhi pertumbuhan sel dan fungsi metabolisme berbagai jenis jaringan (Katzung, 1995).

Aloksan dapat merusak sel β pankreas melalui dua cara yaitu sebagai radikal bebas dan merusak potensial membran. Aloksan bereaksi dengan merusak substansi esensial di dalam sel beta pankreas sehingga menyebabkan berkurangnya granula – granula pembawa insulin di dalam sel beta pankreas. Aksi toksik aloksan pada sel beta diinisiasi oleh radikal bebas yang dibentuk oleh reaksi redoks. Aloksan dan produk reduksinya yaitu asam dialurik akan membentuk siklus redoks dengan formasi radikal superoksida. Radikal ini mengalami dismutasi menjadi hidrogen peroksida. Radikal superoksida dapat membebaskan ion ferri dari ferinitin, dan mereduksi menjadi ion ferro. Adanya ion ferro dan hidrogen peroksida membentuk radikal hidroksil yang sangat reaktif melalui reaksi fenton (Nogroho, 2008). Menurut Winarsi (2007), bahwa logam Fe yang bereaksi dengan radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) dapat menghancurkan struktur sel.