

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian pengaruh pemberian ekstrak biji klabet (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) terhadap kadar transaminase pada hepar mencit (*Mus musculus*) diabetes yang diinduksi dengan streptozotocin ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 5 ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah mencit kontrol negatif (tanpa perlakuan), mencit kontrol positif (diabetes tanpa pemberian ekstrak biji klabet) dan mencit diabetes yang diberi ekstrak biji klabet dengan 3 dosis yang berbeda.

3.2 Variabel penelitian

Variabel pada penelitian ini meliputi:

1. Variabel bebas : biji klabet (*Trigonella foenum-graecum* Linn) dengan dosis yang berbeda.
2. Variabel terikat: variabel yang diukur adalah kadar transaminase hepar mencit.
3. Variabel kendali: jenis mencit yang digunakan adalah mencit jantan dari strain Balb/c yang berumur 2 bulan dengan berat badan rata-rata 20 g dan dikondisikan menjadi diabetes dengan meninduksi streptozotocin.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, pada bulan Agustus sampai Oktober 2009.

3.4 Populasi dan Sampel

Hewan uji yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) galur Balb/c jenis kelamin jantan, umur 2 bulan dengan berat badan rata - rata 20 gram sebanyak 25 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*), tabung reaksi, gelas ukur, timbangan digital, spektrofotometer, spuit, seperangkat alat bedah, tabung *ependorf*, sentrifuge, mortar, dan bak es

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji klabet (*trigonella foenum-graecum* linn), aquadest steril 75 ml, *streptozotocin* (stz) dengan kadar 50mg/kg berat badan, *buffer sitrat* sebanyak 5 ml, ALT/GPT reagen kit, AST/GOT reagen kit, NaCl 0,9 ml, aquadest 1000 ml, dan etanol 90%

3.6 Prosedur Penelitian

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 mencit. Setelah itu dilakukan aklimatisasi di laboratorium selama 1 minggu. Mencit dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol mencit normal (tidak diabetes) dan kelompok mencit diabetes. Untuk menjadi diabetes, mencit diinduksi dengan streptozotocin dengan *multiple low dosis* yaitu 30 mg/kg bb diinjeksikan 1 kali sehari selama 5 hari melalui intraperitoneal. Mencit dengan kadar glukosa melebihi 200 mg/dl dianggap diabetes (Dalimartha, 2007).

Sebelum diinjeksikan, streptozotocin (STZ) dilarutkan dalam buffer sitrat dengan pH 4,5 dan dihomogenkan dengan menggunakan stirer. Kemudian larutan STZ diinjeksikan melalui intraperitoneal sebanyak 0,05 ml tiap ekor, dengan konsentrasi STZ yaitu setiap 0,05 ml larutan mengandung STZ 0,6 mg (Umniyah, 2007).

3.6.2 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak biji klabet (*Trigonella foenum-graecum* Linn) dilakukan melalui tahapan sebagai berikut:

- a. Menyiapkan biji klabet
- b. Dilakukan penyortiran dengan mengambil biji yang terbaik
- c. Biji klabet yang telah disortir kemudian dicuci dengan air mengalir

- d. Biji klabet yang sudah dicuci kemudian dikeringkan dengan cara diangin - anginkan. Dalam pengeringan ini hendaknya dihindarkan dari panas matahari langsung
- e. Biji klabet yang telah kering kemudian diblender
- f. Biji klabet yang telah halus dimaserasi dengan pelarut ethanol 90% sampai residu berubah menjadi bening, sambil sesekali diaduk
- g. Ekstrak yang dihasilkan disaring dengan corong bunchner
- h. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 90⁰C sampai diperoleh ekstrak kental

3.6.3 Persiapan Perlakuan

3.6.3.1 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Sebelum perlakuan pemberian biji klabet, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah untuk memastikan 25 mencit telah mengidap diabetes. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan cara mengambil darah mencit melalui ekor yang terlebih dahulu dibersihkan dengan alkohol. Kemudian darah diteteskan pada strip glukometer dan dimasukkan dalam glukometer untuk dibaca kadar glukosanya.

3.6.3.2 Perhitungan Dosis Biji Klabet

Biji klabet yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Balai Materia Medica, Batu. Gambaran atau model penentuan dosis pada perlakuan dengan hasil ekstraksi penelitian El-Soud (2007), bahwa biji klabet yang diekstrak

diperoleh 2,74%. Biji klabet dikonsumsi oleh manusia setiap hari untuk pengobatan tradisional mulai dari 25 g dibagi dalam 2 kali pengonsumsiannya, masing-masing 12,5 g (\pm 1 sendok makan) (Widawati, 1989).

Berdasarkan angka konversi tersebut diperoleh dosis biji klabet untuk mencit adalah $2,74\% \times 25 \text{ g} = 0,68 \text{ g}$ ekstrak. Sedangkan angka konversi dari manusia 70 kg ke mencit 20 g = 0,0026, maka dosis untuk mencit $20 \text{ g} = 0,0026 \times 0,68 \text{ g} = 1,76 \text{ mg/ekor/hari}$. Pada penelitian ini menggunakan 3 dosis efektif dengan menggunakan deret hitung, maka diperoleh 3 dosis, yaitu:

Dosis I : 0,88 mg/ ekor /hari

Dosis II : 1,76 mg/ ekor /hari

Dosis III : 3,52 mg/ ekor /hari

3.6.3.3 Pembagian Kelompok Sampel

Setelah 25 mencit positif diabetes, mencit dibagi menjadi 5 kelompok, yang terdiri dari:

- a. Kelompok control negatif : mencit normal tanpa diberi biji klabet dan tanpa diinduksi STZ untuk diabetes
- b. Kelompok control positif : mencit diabetes dengan induksi STZ tanpa diberi biji klabet
- c. Kelompok I : mencit diabetes dan diberi biji klabet dosis I
- d. Kelompok II : mencit diabetes dan diberi biji klabet dosis II
- e. Kelompok III : mencit diabetes dan diberi biji klabet dosis III

3.6.4 Kegiatan Penelitian

3.6.4.1 Perlakuan Pemberian Biji Klabet

Pemberian ekstrak biji klabet untuk perlakuan, ditimbang 500 mg CMC Na kemudian ditaburkan pada akuades panas, diaduk sampai CMC Na mengembang, setelah itu ditambahkan 0,89 mg ekstrak biji klabet dan diaduk sampai homogen. Kemudian, ditambah dengan aquadest sampai volumenya 100 ml. Sedangkan untuk sediaan kelompok kontrol negatif dan positif hanya diberi suspensi CMC Na 0,5% tanpa ekstrak biji klabet. Ekstrak biji klabet diberikan pada mencit perlakuan setiap hari sesuai dengan dosis I, II, dan III selama 60 hari. Kadar glukosa darah sesudah perlakuan diukur pada hari ke-1, 30 dan 60.

3.6.4.2 Pembuatan Homogenat Hepar

Mencit dibedah dan diperfusi pada bagian vena porta hepatica, kemudian hepar dicuci dengan menggunakan larutan PBS 10mM. hepar ditimbang dan digerus dengan mortar. Selanjutnya ditambahkan dengan 10 kali volume NaCl 0,9% dan dihomogenkan sampai rata. Homogenate hepar disentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit. Supernatant dipisahkan dengan pellet dan diletakkan padatabung ependorf.

3.6.4.3 Pengukuran GPT Dan GOT

Mengambil reagen 1 dan reagen 2 dengan perbandingan (4:1) kemudian mencampurkan reagen tersebut hingga homogeny. Selanjutnya larutan

monoreagen tersebut dimasukkan dalam botol dan ditutup dengan aluminium foil. Larutan monoreagen ini dapat disimpan sebagai stok pada suhu 2-8°C. mengambil supernatant hepar sebanyak 100µl dan ditambahkan 1000µl larutan monoreagen kemudian dihomogenkan. Selanjutnya mengukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Pembacaan absorbansi dilakukan setiap menit selama 3 menit. Kadar transaminase dalam serum diukur dengan metode kalorimetrik atau lebih teliti dengan metode spektrofotometrik (Hushada, 2004).

3.6.4.4 Pembuatan Preparat Sayatan Hepar

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 hepar yang telah disimpan dalam larutan formalin 10% dicuci dengan alkohol selama 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 hepar 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 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 alkohol 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 diamati dibawah mikroskop dan dipotret kemudian dicatat data skor kerusakan islet pankreas.
12. Pemotretan preparat dalam pengamatan dimikroskop disajikan secara jelas

3.7 Data Dan Teknik Pengambilan Data

Data dalam penelitian ini berupa kadar GOT dan GPT pada hepar mencit.

Data yang diperoleh dimasukkan dalam tabel berikut:

Tabel 3.6.1 Kadar GPT pada hepar mencit

perlakuan	Kadar GPT (U/I)				
	1	2	3	4	5
K (-)					
K (+)					
D1					
D2					
D3					

Tabel 3.6.2 Kadar GOT pada hepar mencit

Perlakuan	Kadar GOT (U/I)				
	1	2	3	4	5
K (-)					
K (+)					
D1					
D2					
D3					

Keterangan:

- I :Kelompok control negatif : mencit normal tanpa diberi biji klabet dan tanpa diinduksi STZ untuk diabetes
- II :Kelompok control positif : mencit diabetes dengan induksi STZ tanpa diberi biji klabet
- III : mencit diabetes dan diberi biji klabet dosis I
- IV : mencit diabetes dan diberi biji klabet dosis II
- V : mencit diabetes dan diberi biji klabet dosis III

3.7 Analisis Data

3.7.2 Teknik Pengambilan Data Skoring

Teknik pengambilan data skoring pada kerusakan hepar:

- a. Kategori kerusakan rendah bila didapatkan nilai skor ≤ 5 (degenerasi) dengan ciri-ciri: sel hati berwarna lebih gelap dan peradangan vena sentral
- b. Kategori risiko sedang bila nilai skor 6-10 (nekrosis) dengan ciri-ciri: sel hati nekrotik tanpa pulasan inti, sel tidak tampak reaksi disertai radang, dan tampaknya fragmen

- c. Kategori risiko berat bila nilai skor 11-15 (karioreksis) dengan ciri-ciri: inti sel hancur dan meninggalkan zat kromatin yang tersebar dalam sel
- d. Kategori risiko sangat berat bila skor ≥ 16 (kariolisis) dengan ciri-ciri: inti sel yang mati menghilang

3.7 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian biji klabet terhadap kadar transaminase hepar mencit diabetes mellitus yang diinduksi streptozotocin, data hasil pengamatan yang sudah ditabulasi diuji statistik dengan uji ANOVA (*Analysis Of variance*). Jika hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan maka dilanjutkan dengan uji lanjut BNJ dengan parameter $\alpha = 0,01$ pada derajat kepercayaan 99%.