

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 5 perlakuan dan 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 Variable penelitian**

Variabel pada penelitian ini meliputi:

1. Variabel bebas: biji klabet (*Trigonella foenum-graecum* L) dengan dosis yang berbeda.
2. Variabel terikat: kadar glukosa darah dan gambaran histologi pankreas mencit.
3. Variabel kendali: mencit jantan galur Balb/c umur 2 bulan dengan berat badan rata-rata 20 g

#### **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 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 g sebanyak 25 ekor.

### **3.5 Alat dan Bahan**

#### **3.5.1 Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang hewan coba (bak plastik), kawat, tempat pakan, minum mencit, Erlenmeyer 50 mL, gelas ukur, *beacker glass*, kaca pengaduk, kertas saring, objek glass, *deck glass*, timbangan digital, ayakan tepung, mikroskop, corong Buchner, perangkat evaporator, glukometer (*Accu Ceck Active*), *strip glukotest* alat pencekok oral (*gavage*).

#### **3.5.2 Bahan**

Biji klabet (*Trigonella foenum-graecum* L), pakan mencit (pellet), serbuk kayu, *Streptozotocin*, 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**

Mencit diaklimatisasi di laboratorium selama 3 minggu kemudian dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol mencit normal (tidak diabetes) dan kelompok mencit diabetes. Untuk menjadi diabetes, mencit diinduksi dengan streptozotocin dengan dosis tunggal yaitu 50 mg/kg bb diinjeksikan 1 kali dengan

cara intraperitoneal. Mencit dengan kadar glukosa melebihi 140 mg/dl dianggap diabetes (Dalimartha, 2007).

Sebelum diinjeksikan, streptozotocin dilarutkan dalam buffer sitrat (0,05M Sodium sitrat pada pH=4,5) dan dihomogenkan dengan menggunakan stirer. Pembuatan larutan STZ dilakukan dengan penghitungan sesuai dosis injeksi dengan konsentrasi 50 mg STZ setiap 2,5 mL *buffer sitrat*. Injeksi sebanyak 0,05 mL tiap ekor mencit (Suharmiati, 2003).

### **3.6.2 Pembuatan Ekstrak**

Pembuatan ekstrak biji klabet (*Trigonella foenum-graecum* L) 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 70% 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 70<sup>0</sup>C sampai diperoleh ekstrak kental

### 3.6.3 Penghitungan Dosis

Biji klabet yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Balai Materia Medica, Batu. Gambaran atau model penentuan dosis pada perlakuan dengan mendasarkan pada hasil ekstraksi penelitian El-Soud (2007), bahwa biji klabet yang diekstrak diperoleh 2,74%. Sedangkan pada penelitian Widowati (1989), menyatakan bahwa pengonsumsi serbuk biji klabet oleh manusia setiap hari untuk pengobatan tradisional mulai dari 25 g dibagi dalam 2 kali pengonsumsi, masing-masing 12,5 g ( $\pm 1$  sendok makan).

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 uji dengan menurunkan dan menaikkan dari dosis optimal menurut deret hitung:

Dosis I = 0,88 mg/ekor/hari

Dosis II = 1,76 mg/ekor/hari

Dosis III = 3,52 mg/ekor/hari

### 3.6.3 Prosedur Perlakuan

Sebelum perlakuan pemberian ekstrak biji klabet, dilakukan pengukuran kadar glukosa darah sebelum perlakuan. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan menggunakan glukometer dengan prosedur sebagai berikut:

a. Persiapan glukometer, strip dipersiapkan untuk mengukur

- b. Pengambilan sampel darah, mencit diletakkan pada sungkup, ekor mencit 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 biji klabet untuk perlakuan, ditimbang 500 mg *Carboxyl Methyl Cellulose* (CMC) Na kemudian ditaburkan pada akuades panas, diaduk sampai CMC Na mengembang, setelah itu ditambahkan 0,88 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 ml tanpa ekstrak biji klabet (Studiawan dan Mulja, 2005). Ekstrak biji klabet diberikan pada mencit perlakuan setiap hari sesuai dengan dosis I, II, dan III selama 30 hari. Kadar glukosa darah sesudah perlakuan diukur pada hari ke-1 dan 30 setelah perlakuan. Prosedur pengukuran kadar glukosa darah sama seperti diatas. Sedangkan derajat insulinitas diamati pada akhir penelitian (30 hari).

#### **3.6.4 Pembuatan Preparat Sayatan Pankreas**

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 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 pankreas dipotong dengan ukuran  $\mu\text{m}$ , 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 obyektif 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.
12. Hasil akhir diamati dibawah mikroskop, untuk setiap ekor mencit, satu preparat dengan tiga bidang pandang pengamatan, dipotret kemudian dicatat data skor kerusakan islet pankreas

### 3.7 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian biji klabet terhadap kadar gula darah mencit diabetes mellitus yang diinduksi streptozotocin, data hasil pengamatan yang sudah ditabulasi diuji statistik dengan ANKOVA (*Analysis Of Covariance*). Apabila terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan pengujian BNT 5%. Untuk mengetahui derajat insulinitis dilakukan melalui penghitungan tingkat

kerusakan pulau Langerhans pada tiga luas bidang pandang setiap satu ekor mencit. Pemberian skor dapat dilakukan dengan cara memprosentase jumlah kerusakan yang terdapat setiap satu preparat. Nilai skor = 0, jika tidak terdapat kerusakan. Nilai skor = 1 jika terdapat  $\frac{1}{4}$  kerusakan, nilai skor = 2 untuk  $\frac{1}{2}$  kerusakan, dan nilai skor = 3 untuk kerusakan lebih dari  $\frac{1}{2}$  dari islet. Kemudian data skor tingkat kerusakan pankreas dianalisis dengan non-parametrik *Kruskal Wallis*.

