

## BAB IV

# MATERI DAN METODE PENELITIAN

## **BAB IV**

### **MATERI DAN METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik memakai Rancangan Acak Lengkap ( Steel and Torrie, 1989 ).

#### **4.2. Sampel dan Besar Sampel**

Penelitian ini menggunakan mencit jantan albino Swiss - Webstar sebagai hewan percobaan, berumur 2 – 3 bulan, berat badan antara 20 – 30 gram dan sehat. Estimasi besar sampel ditentukan berdasarkan rumus Higgins dan Kleinbaum ( 1985 ) yaitu sebanyak 50 ekor yang dibagi dalam lima kelompok perlakuan dan masing – masing kelompok terdiri dari 10 ekor.

#### **4.3. Variabel penelitian**

##### **4.3.1. Klasifikasi variabel**

##### **A. Variabel Bebas**

Dalam penelitian ini digunakan kombinasi 2 variabel bebas, yaitu :

1. Variabel pemberian aloxan sebagai diabetogenik
2. Variabel penambahan antioksidan Probucol

**B. Variabel kendali**

Dalam penelitian ini digunakan beberapa variabel kendali, yaitu :

1. Mencit yang digunakan berjenis kelamin jantan, Albino Swiss - Webstar.
2. Usia mencit antara 2 – 3 bulan.
3. Berat badan mencit antara 20 – 30 gram.
4. Pakan mencit adalah pakan ayam jenis Par G dari PT Charoen Pokphand yang dibuat pellet.
5. Kandang dengan kondisi sama.

**C. Variabel akibat ( Tergantung )**

1. Kadar glukosa darah mencit
2. Gambaran Histopatologi Ginjal Mencit yang mengalami hiperglikemi.

**4.3.2. Definisi Operasional Variabel**

1. Aloksan monohidrat adalah suatu bahan yang digunakan untuk Induksi Diabetes Mellitus.
2. Probucol adalah suatu antioksidan sintetik yang bersifat lipofilik.
3. Kadar glukosa darah adalah konsentrasi glukosa dalam satuan mg dalam 100 ml darah.

4. Nefropati Diabetik adalah Nefropati yang disebabkan oleh diabetes melitus yang dapat dilihat dari gambaran histopatologi ginjal.

#### **4.4. Bahan Penelitian**

##### **4.4.1. Hewan percobaan**

Untuk memperoleh hewan percobaan dengan diabetes mellitus digunakan mencit karena cukup peka untuk menjadi DM dan termasuk mammalia kecil yang murah ( Gosh, 1971; Allington, 1972; Bleby & Festung, 1972 ). Mencit yang digunakan berasal dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Pusat Veterinaria Farma Surabaya .

##### **4.4.2. Bahan Pakan dan Minum**

Pakan mencit yang dipakai adalah pakan ayam jenis Par G yang dibuat pellet dari PT Charoen Pokphand Indonesia, animal Feedmill Co. Ltd. Air minum yang digunakan adalah air bersih dari PDAM Surabaya. Pemberian pakan dan air minum dilakukan secara ad libitum.

##### **4.4.3. Bahan Uji**

Bahan uji pada penelitian ini adalah Probucol dengan derajat kemurnian p.a ( pro analisis ) yang diperoleh dari Sigma Chemical Industries.

#### 4.4.4. Bahan Kimia

Bahan kimia yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah :

- Aloksan monohidrat dan NaCl 0,9% untuk membuat mencit hiperglikemi.
- CMC Na dan aqua pro injeksi untuk membuat suspensi Probucol.
- Larutan formalin 10% untuk mengawetkan organ ginjal dan pankreas.
- Ether untuk anestesi mencit.
- Bahan – bahan untuk pemeriksaan patologi anatomi ginjal dan pankreas.

#### 4.5. Instrumen Penelitian

Alat – alat yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- Timbangan obat, gelas ukur, spuit 3 cc, spuit 1 cc, pengaduk, mortar, pipet, tabung reaksi beserta raknya, obyek glass, cover glass, mikroskop cahaya, sarung tangan, masker, kandang mencit, tempat pakan dan minum, glukometer sure step ( lifescan ) beserta sticknya, mes, scalpel, gunting, sonde untuk mencit, botol kaca.

#### 4.6. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Pemeriksaan histopatologi

pankreas dan ginjal dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

#### 4.7. Prosedur Penelitian

##### 4.7.1. Persiapan Penelitian

###### a. Hewan Percobaan

Hewan percobaan dipilih mencit jantan albino Swiss – Webster, umur 2 – 3 bulan dengan berat badan 20 – 30 gram, sehat fisik yang ditandai dengan bulu putih bersih dan tampak aktif. Sebelum perlakuan hewan – hewan ini diadaptasikan selama 1 minggu dengan diberi pakan Par G dan air minum PDAM secara *ad libitum*.

###### b. Pembuatan Larutan Aloksan Monohidrat

Aloksan monohidrat dilarutkan dalam NaCl fisiologis 0,9 %. Dibuat larutan aloksan dosis 140 mg / kg BB, dengan pemberian sebanyak 0,001 ml pergram berat badan secara intra peritoneal, satu kali pemberian.

###### c. Pembuatan Suspensi Probucol

Probucol dilarutkan dalam aqua pro injeksi dengan suspensator CMC Na 0,5 %. Dibuat suspensi probucol dosis 0,65 mg / 20 gr BB; 1,3 mg / 20 gr BB; dan 2,6 mg / 20 gr BB, dengan pemberian sebanyak 0,001 ml pergram berat badan secara oral dengan sonde, sekali sehari selama 28 hari.

#### d. Proses Pembuatan Mencit Diabetes Mellitus

Mencit ditimbang, lalu dipuasakan 18 jam hanya diberi minum air. Dipotong ujung ekornya untuk diperiksa kadar gula darah puasa kemudian disuntik secara intra peritoneal dengan larutan aloksan monohidrat dosis 140 mg / kg BB pada sejumlah mencit menggunakan hewan berlebih. Berdasarkan penelitian setelah 48 jam dengan kadar glukosa darah puasa antara 150 – 450 mg / dl. Hanya mencit yang kadar glukosa darahnya antara 200 – 400 mg / dl yang dipakai untuk penelitian selanjutnya.

#### 4.7.2. Penelitian Pendahuluan

Sebelum penelitian, dilakukan penelitian pendahuluan dengan pemeriksaan hispatologis pankreas untuk menentukan dosis aloksan dan banyaknya sel beta yang tidak mengalami degenerasi. Selain itu penelitian pendahuluan juga bertujuan untuk menentukan jumlah sampel, menentukan saat terjadinya hiperglikemi, peningkatan kadar glukosa darah.

#### 4.7.3. Tahap Perlakuan

##### a. Pengelompokan Perlakuan

Setelah diperoleh mencit Diabetes Mellitus ( 48 jam sesudah penyuntikan aloksan monohidrat ), 40 ekor mencit dengan kadar glukosa darah puasa ( puasa 18 jam ) antara 200

- 400 mg / dl dibagi secara acak kedalam 4 kelompok, masing
- masing kelompok terdiri dari 10 ekor mencit.

Kelompok P1 (kontrol +) : 10 ekor mencit DM hanya diberi  
CMC Na 0,5 % + aqua secara oral  
dengan sonde, sekali sehari,  
selama 28 hari.

Kelompok P2 : 10 ekor mencit DM diberi suspensi  
probucol dosis 0,65 mg / 20 gr BB  
secara oral dengan sonde, sekali  
sehari, selama 28 hari.

Kelompok P3 : 10 ekor mencit DM diberi suspensi  
probucol dosis 1,3 mg / 20 gr BB  
secara oral dengan sonde, sekali  
sehari, selama 28 hari.

Kelompok P4 : 10 ekor mencit DM diberi suspensi  
probucol dosis 2,6 mg / 20 gr BB  
secara oral dengan sonde, sekali  
sehari, selama 28 hari.

Kelompok P0 (Kontrol -) : 10 ekor mencit yang tidak dibuat  
DM, diberi CMC Na 0,5% + aqua  
secara oral dengan sonde sekali  
sehari selama 28 hari.

Pada hari ke 29 setelah mendapat perlakuan, seluruh hewan percobaan dari semua kelompok dianastesi dengan ether dan



dilakukan otopsi untuk diambil ginjalnya. Selanjutnya ginjal dimasukkan dalam botol kaca yang berisi larutan formalin 10 %, setelah 24 jam kemudian dilakukan pemeriksaan histopatologi terhadap ginjal untuk mengetahui adanya perubahan struktur ginjal dan terjadinya nefropati diabetik struktural.

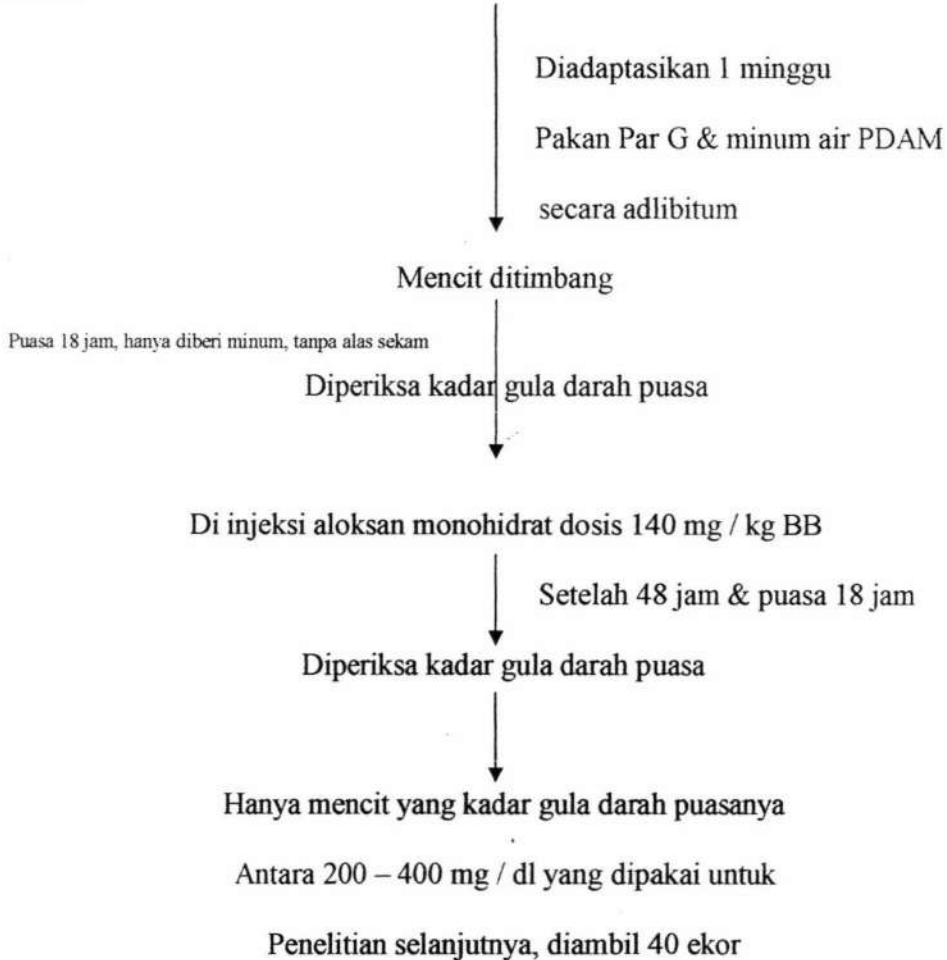
#### **4.8. Analisis Data**

Data yang terkumpul dari gambaran histopatologi ginjal dianalisis dengan uji analisis varian (ANOVA). Bila terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan, dilanjutkan dengan uji LSD.

## ALUR PENELITIAN

### 1. TAHAP PEMBUATAN MENCIT DIABET

Mencit jantan, albino, Swiss – Webster, umur 2–3 bulan, BB 20–30 gram, sehat.



Catatan :

Pemeriksaan kadar gula darah dilakukan dengan cara memotong ujung ekor mencit dan diperiksa dengan Glucometer Surestep Lifescan.

## II. TAHAP PERLAKUAN

10 ekor mencit kontrol (yang tidak dibuat diabet )

40 ekor mencit dengan kadar gula darah puasa antara 200 - 400 mg / dl, dibagi secara random dalam 4 kelompok, masing – masing 10 ekor mencit

