

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam penelitian eksperimental. Penelitian eksperimental adalah penelitian yang dilakukan dengan pengadaan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003).

B. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dimana terdapat kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Kelompok hewan uji terdiri dari lima kelompok. Kelompok perlakuan pemberian maserat *Aloe vera* terdiri dari tiga kelompok. Masing-masing kelas diberi perlakuan dengan pemberian maserat daun *Aloe vera* 0,70 ml/100 gram BB/hari; 1,05 ml/100 gram BB/hari; 1,40 ml/100 gram BB/hari. Kemudian terdapat kontrol netral, kelompok ini terdiri dari kelompok mencit yang tidak diberi perlakuan, lalu kontrol positif, tidak diberi maserat *Aloe vera* namun diberi aloksan. Banyaknya pengulangan (replikasi) yang dilakukan diperoleh dari Gomez & Gomez (1995) yaitu:

$$(T - 1)(r - 1) > 15$$

$$(5 - 1)(r - 1) > 15$$

$$4r - 4 > 15$$

$$r > 19/4$$

$$r > 5$$

Keterangan: T = jumlah perlakuan

r = jumlah replikasi

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah pengulangan yang dilakukan untuk setiap perlakuan ialah $r \geq 5$. pengulangan yang dibutuhkan pada setiap kelompok sebanyak 5 kali atau 5 ekor mencit sehingga jumlah total mencit yang digunakan sebanyak 25 ekor ditunjukkan dari hasil perhitungan diatas. Setiap mencit diberi nomor (1–25) dan setiap kandang diberi tanda (A–E) untuk

menunjukkan kelompok yang berbeda. Setelah itu, randomisasi dilakukan untuk pengelompokan setiap mencit sehingga didapatkan kelompok mencit yang akan menempati setiap kandang.

Tabel 3.1 Pengaturan Randomisasi Mencit.

1C	2A	3E	4E	5C
6C	7E	8A	9A	10C
11B	12D	13A	14D	15D
16B	17E	18D	19E	20C
21B	22B	23D	24B	25A

Tabel 3.2 Hasil randomisasi mencit dan jenis perlakuan.

Kandang	Perlakuan	NomorMencit				
A	Kontrol netral	2	25	8	13	9
B	Kontrol positif	22	11	16	21	24
C	<i>Aloe vera</i> 0,70 ml/ 100 g BB/ hari	10	5	1	20	6
D	<i>Aloe vera</i> 1,05 ml/ 100 g BB/ hari	12	23	14	15	18
E	<i>Aloe vera</i> 1,40 ml/ 100 g BB/ hari	17	4	19	3	7

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh mencit (*Mus musculus*) jantan. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah pulau Langerhans pankreas mencit (*Mus musculus*) jantan usia empat bulan.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Perlakuan dilakukan di kandang mencit pribadi di Geger Kalong, Bandung. Pengamatan sampel dilakukan di Laboratorium Struktur Tumbuhan Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI Bandung. Waktu yang digunakan untuk penelitian ini yaitu kurang lebih dua bulan.

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang diperlukan dalam penelitian dipersiapkan. Daftar alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian yang digunakan terdapat pada Lampiran 7.

b. Persiapan Hewan Uji Coba (*Mus musculus*)

Hewan yang digunakan adalah 25 ekor mencit (*Mus musculus*) jantan albino dengan berat sekitar (20-30 gram). Mencit ini didapat pertama kali saat berumur tiga bulan dan sebelum ke tahap perlakuan, seluruh hewan percobaan diaklimatisasi selama 30 hari hingga usianya mencapai empat bulan. Penimbangan berat badan dilakukan selama aklimatisasi dan selama perlakuan. Dua puluh lima ekor mencit (*Mus musculus*) ini dipelihara dalam lima kandang yang dipelihara di rumah di kawasan Geger Kalong. Kandang mencit terbuat dari wadah plastik berukuran 28 cm x 30 cm x 12 cm. Wadah plastik diberi medium tempat hidup mencit berupa serutan kayu. Bagian atas bak ditutupi ram kawat untuk mencegah mencit keluar dari kandang. Kandang diberi tempat minum mencit sebanyak satu buah setiap kandang. Keadaan selama aklimatisasi dan perlakuan dikontrol pada kisaran lingkungan yang tetap dengan tujuan agar hewan uji beradaptasi dengan kondisi yang akan ditempati selama percobaan. Selama percobaan suhu ruangan berkisar antara 23°C-27°C. Makanan yang diberikan adalah PC 551 sebanyak 5 gram/ekor mencit dan minum berupa air matang dengan cara *ad libitum*. Pencahayaan dilakukan selama 12 jam/hari dari pukul 06.00 WIB hingga 18.00 WIB.

c. Pembuatan Maserat Lidah Buaya (*Aloe vera*)

Pembuatan maserat lidah buaya dilakukan dengan. Metode maserasi atau perendaman (Pachanawan *et al.*, 2008) dengan beberapa modifikasi. Pelarut yang digunakan dalam pembuatan maserat ini adalah alkohol 70%. Sampel *Aloe vera*

adalah daun lidah buaya yang berasal dari perkebunan lidah buaya di Subang, Jawa Barat. Determinasi didasarkan pada buku klasifikasi Conquist. Dilanjutkan dengan pemilihan daun yang berdaging banyak.

Tanaman direndam pada pelarut dengan perbandingan 1:2 (w/v), pada penelitian ini digunakan 500 gram potongan gel yang telah dianginkan selama 48 jam untuk menghilangkan eksudatnya dan dilarutkan dalam 1 L alkohol 70%. Perendaman dilakukan selama 72 jam untuk melarutkan komponen bioaktifnya kemudian dilakukan penyaringan bertahap untuk memisahkan larutan dengan ampas potongan tanaman. Terakhir dilakukan evaporasi alkohol pada suhu ruang untuk menghasilkan ekstrak dalam akuades. Hasil ekstrak akhir diuji kandungannya dengan menggunakan GCMS OP-2010 Ultra yang dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik UPI Bandung.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Penginduksian Aloksan

Aloksan merupakan derivat pirimidin sederhana yang merusak sel beta pankreas sehingga menurunkan produksi insulin. Pada tahap pelaksanaan ini dilakukan induksi pemberian aloksan untuk menciptakan keadaan hiperglikemik pada mencit (*Mus musculus*). Aloksan yang didapatkan dalam bentuk serbuk 10 gram yang kemudian dilarutkan dengan akuades sebanyak 1 L. Dalam percobaan ini mencit disuntikan aloksan sebanyak 0,65 ml/ 100 gram BB secara intravena melalui ekor (Nugrahani, 2008). Hewan percobaan yang telah diadaptasi selama 1 minggu diinduksi dengan aloksan 0,65 ml/ 100 gram BB secara intravena melalui ekornya. Pemberian aloksan dilakukan satu sekali lalu untuk melihat pengaruhnya dilakukan optimasi selama 72 jam (Simanjuntak *et al.*, 2002).

b. Pemberian Maserat *Aloe vera*

Pemberian maserat *Aloe vera* dilakukan selama 30 hari secara *gavage*, satu kali dalam sehari. Tiap mencit dalam kelompok perlakuan diberi maserat *Aloe vera* sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Dosis maserat *Aloe vera* yang diberikan adalah 0.70 , 1.05, dan 1.40 ml/ 100 gram BB/ hari untuk 3 kelompok

perlakuan. Jarum *gavage* digunakan pada saat pemberian maserat lidah buaya terhadap hewan uji, dimana hewan percobaan dibagi 5 kelompok :

- a. Kelompok I adalah kelompok kontrol netral yang tidak diberi induksi apapun.
- b. Kelompok II adalah kelompok kontrol positif yaitu hewan yang diberi induksi aloksan namun tidak diberi maserat *Aloe vera*.
- c. Kelompok III adalah kelompok hewan hasil induksi aloksan yang diberi maserat lidah buaya dengan dosis 0,70 ml/ 100 gram BB/ hari
- d. Kelompok IV adalah kelompok hewan hasil induksi aloksan yang diberi maserat lidah buaya dengan dosis 1,05 ml/ 100 gram BB/ hari.
- e. Kelompok V adalah kelompok hewan hasil induksi aloksan yang diberi maserat lidah buaya dengan dosis 1,40 ml/ 100 gram BB/ hari.

Penggunaan tabel konversi Laurence & Bacharach (1964) digunakan dalam penentuan dosis yang didasarkan pada penelitian yang pernah dilakukan pada tikus putih dengan nilai konversi tikus putih 200 gram ke mencit 20 gram senilai 0,14 (Lampiran 7).

3. Tahap Pembuatan Preparat Histologi Pankreas

a. Pengambilan Organ Pankreas

Pada akhir perlakuan (hari ke-30 pasca induksi aloksan dan maserat *Aloe vera*) semua mencit dilakukan pembedahan dengan penyayatan pada kulit dan otot abdominal hingga rongga perut terbuka. Selanjutnya dilakukan pengambilan organ pankreas. Pankreas yang telah dipisahkan dari tubuh hewan dibersihkan dengan larutan NaCl 0,9% lalu diukur panjang dan beratnya. Setelah itu, organ pankreas difiksasi dengan formalin 10% sampai tahap pembuatan blok parafin.

b. Pembuatan Preparat Histologi

Pembuatan preparat histopatologi pada organ pankreas dilakukan dengan prosedur sebagai berikut;

i. Fiksasi

Sediaan organ pankreas direndam dalam larutan formalin 10%.

ii. Dehidrasi

Pankreas yang sudah difiksasi dengan formalin dipindahkan kedalam larutan alkohol bertingkat (60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, alkohol absolut) masing-masing selama 2 jam.

iii. Penjernihan

Setelah itu organ dimasukkan kedalam larutan alkohol absolut yang dicampur dengan xilol (1:1) selama 10 menit. Kemudian organ dipindahkan kedalam xilol murni selama 15 menit.

iv. Penanaman

Organ yang sudah jernih dipindahkan kedalam campuran xilol parafin lunak (1:1) lalu dimasukkan kedalam oven dengan suhu 48°C selama 30 menit. Setelah itu dipindahkan kedalam parafin lunak murni lalu dimasukkan kembali kedalam oven dengan suhu 48°C selama 1 jam. Lalu dipindahkan lagi kedalam parafin keras dan dimasukkan kedalam oven 58°C selama 1.5 jam. Setelah itu dilakukan *embedding* (penanaman organ di blok) dengan ukuran blok 2x1.

v. Penyayatan

Setelah pembuatan blok selesai diamkan blok parafin sampai keras dan siap untuk disayat. Setelah itu masing-masing blok disayat dengan ketebalan 4 (empat) mikron dengan alat mikrotom, lalu lembaran-lembaran atau pita parafin hasil penyayatan dilekatkan diatas *object glass* yang sudah diberi larutan Haupt dan akuades dan dapat dilakukan pewarnaan.

c. Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Pewarnaan yang akan dilakukan adalah pewarnaan hematoxylin-eosin. Pewarnaan hematoksilin-eosin (HE) termasuk dalam jenis pewarnaan ganda (double staining) karena dua jenis zat warna digunakan untuk pengamatan struktur umum jaringan. Pada pewarnaan ganda umumnya pewarna yang digunakan satu bersifat asam dan yang lain bersifat basa. Kekontrasan dan pengenalan bagian tertentu dapat lebih cepat dan lebih jelas terlihat disebabkan perpaduan sifat tersebut bagian-bagian yang bersifat asidofilik dan basofilik.

Tahapan yang dilakukan dalam pewarnaan HE dimulai dengan proses deparafinisasi, yaitu penghilangan parafin dengan memasukkan preparat ke dalam seri larutan xilol III, xilol II, dan xilol I. Kemudian dilanjutkan dengan proses rehidrasi, yaitu dengan memasukkan preparat ke dalam seri larutan alkohol absolut sampai alkohol 70% secara berurutan. Preparat diwarnai dengan pewarna hematoksilin dilanjutkan dengan pencucian dalam akuades. Setelah itu preparat diwarnai dengan eosin lalu preparat dimasukan kedalam alkohol bertingkat mulai alkohol 70% sampai alkohol absolut setelah itu dilakukan penjernihan (*clearing*) dengan xilol murni. Sediaan ditutup dengan *cover glass (mounting)* dan siap untuk dilakukan pengamatan di bawah mikroskop.

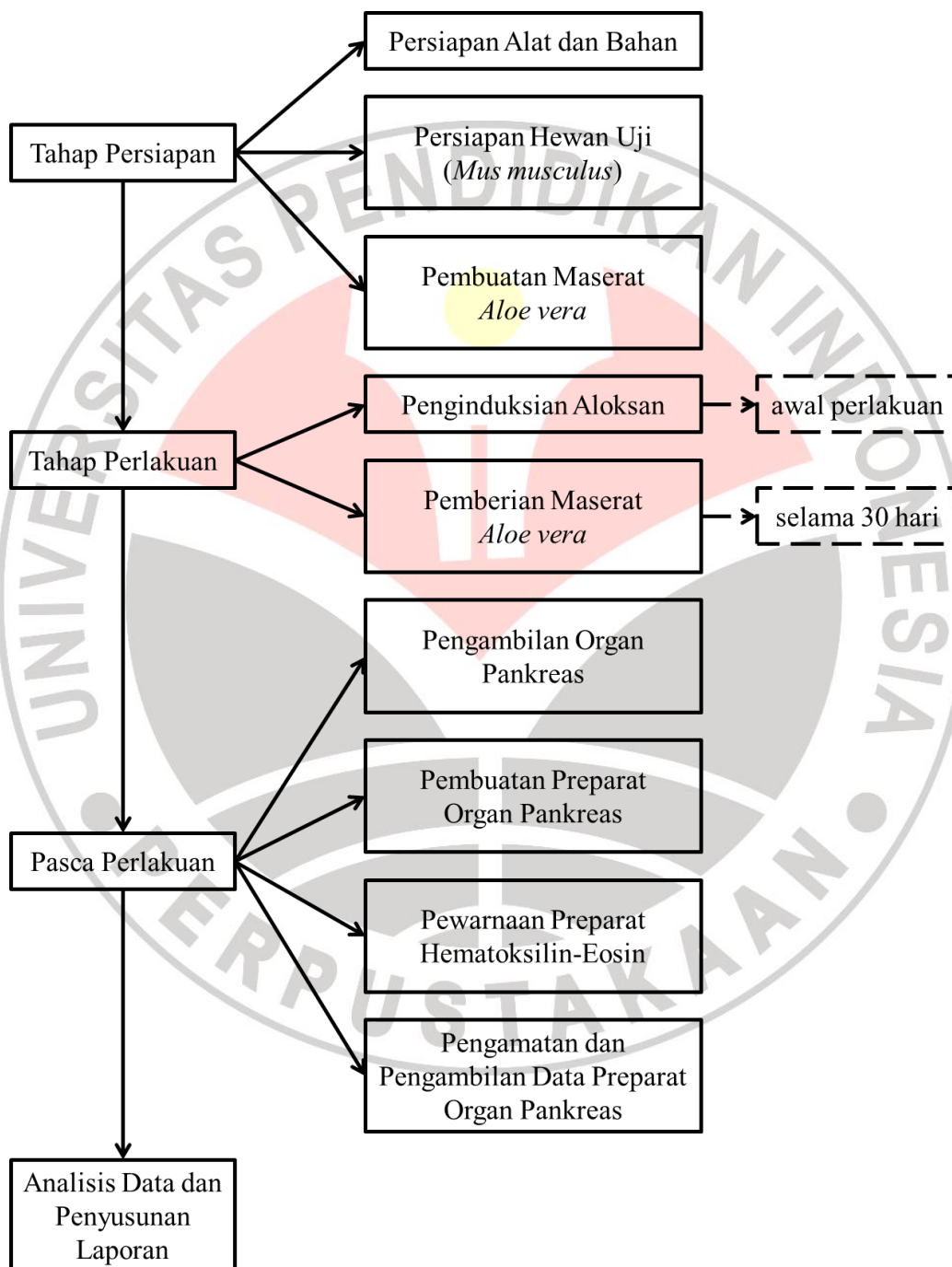
4. Pengamatan dan Analisis Data

Parameter pengamatan adalah perubahan gambaran histologi pankreas mencit secara kuantitatif, yaitu jumlah pulau Langerhans dan luas pulau Langerhans. Penghitungan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya, dan mikrometer serta didokumentasikan dengan pemotretan menggunakan digital camera (Nikon Coolpix S4100). Penghitungan jumlah pulau Langerhans, dilakukan pada tiga lapang pandang pada satu preparat pada perbesaran 1000x yang berbeda secara acak pada setiap preparat jaringan. Penghitungan luas pulau Langerhans dilakukan satu lapang pandang pada satu preparat pada perbesaran 1000x yang berbeda secara acak pada setiap preparat jaringan. Data yang didapatkan diuji nilai normalitas, homogenitas dan signifikansinya.

Test of Normality (Kolmogorov-Smimov) digunakan untuk uji normalitas dan *Test of Homogeneity of Variances (Levene Statistic)* digunakan untuk uji homogenitas. Data yang berdistribusi normal atau bervariasi homogen dianalisis secara statistik parametrik yaitu, analisis varian (*ANOVA*). Data yang memiliki nilai signifikansi dibawah 0,5 pada uji *ANOVA* kemudian diuji lebih lanjut dengan uji lanjut *Post Hoc LSD* untuk mengetahui data yang tidak memiliki perbedaan signifikan terhadap data lainnya. *Software PASW Statistics 18* digunakan untuk analisis data dalam penelitian ini.

5. Alur Penelitian

Urutan penjelasan mengenai prosedur penelitian yang akan dilakukan yaitu sebagai berikut:



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian