

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test control group design*. Penelitian dilakukan dengan cara membandingkan hasil observasi pada kelompok eksperimental dan kontrol. Subjek penelitian yang akan digunakan adalah 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague dawley*, sehat, umur 3 sampai 4 bulan dengan berat badan 100-200 gram yang dikelompokkan secara randomisasi ke dalam 5 kelompok.

#### **3.2 Tempat dan Waktu**

Penelitian dilakukan selama empat bulan dengan tempat penelitian di FK Unila, pembuatan ekstraksi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Unila dan pembuatan preparat histopatologi di laboratorium Patologi Anatomi FK Unila.

#### **3.3 Populasi dan Sampel**

Populasi penelitian ini adalah tikus jantan galur *Sprague dawley*, umur 3-4 bulan, berat badan 100-200 gram yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Sampel penelitian sebanyak 25 ekor dipilih secara acak dan dibagi ke dalam 5 kelompok perlakuan sesuai dengan rumus

Federer (Bintari, 2014). Rumus Federer, rumus yang digunakan dalam penentuan besar sampel untuk uji eksperimental yakni  $t(n-1) > 15$ . Dimana  $t$  merupakan kelompok perlakuan dan  $n$  adalah besar sampel setiap kelompok.

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

$$5n - 5 > 15$$

$$5n > 20$$

$$n > 4$$

jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor ( $n > 4$ ) dan jumlah kelompok yang akan digunakan adalah 5 kelompok sehingga penelitian ini akan menggunakan 25 ekor tikus putih dari populasi yang ada.

### 3.3.1 Kriteria Inklusi

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* jantan, memiliki berat badan (BB) 100-200 gram, usia kurang lebih 3-4 bulan dan sehat (rambut tidak kusam, rontok, botak, dan aktif).

### 3.3.2 Kriteria Eksklusi

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* jantan mati selama waktu penelitian dilakukan, adanya penurunan berat badan (BB) lebih dari 10% selama masa adaptasi di laboratorium, sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif).

### **3.4 Bahan dan Alat Penelitian**

#### **3.4.1 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan yaitu aspirin dengan aspirin 90 mg, ekstrak kulit pisang kepok dengan dosis 125 mg/kgBB, 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB, aquadest, alkohol 96%, tikus putih jantan dewasa galur *Sprague dawley*, pakan dan minum tikus.

#### **3.4.2 Bahan Kimia**

Bahan yang digunakan untuk membuat preparat histologis dengan metode paraffin meliputi: larutan formalin 10% untuk fiksasi, alkohol 70%, alkohol 96%, alkohol absolut, etanol, xylol, pewarna Hematoksisilin dan Eosin (H & E), dan entelan.

#### **3.4.3 Alat Penelitian**

##### **a. Alat selama Perlakuan**

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah neraca analitik metler toledo, dengan tingkat ketelitian 0,01 gram untuk menimbang berat tikus, spuit oral 1 cc dan 5 cc, minor set untuk membedah perut tikus (laparatomi), kandang tikus, botol minum tikus, mikroskop cahaya, gelas ukur dan pengaduk, dan kamera digital.

##### **b. Alat dalam Pembuatan Preparat Histopatologi**

Alat pembuat preparat histopatologi yang digunakan adalah *object glass, deck glass, tissue cassette, rotary microtome, oven, waterbath, platening table, autotechnicome processor, staining jar, staining rack, kertas saring, histoplast*, dan *paraffin dispenser*.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Prosedur Pemberian Aspirin

Penentuan dosis yang diberikan pada perlakuan terhadap tikus berdasarkan hasil konversi dari manusia berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram. Angka konversi dari manusia ke tikus adalah 0,018. Dosis aspirin yang dapat memicu kerusakan mukosa ginjal pada manusia dewasa dengan berat badan 70 kg adalah 5 g/hari. Pemakaian dosis harian aspirin sebesar 4-5 gram dapat menimbulkan kerusakan ginjal dalam minggu pertama pemakaian. Sehingga, dosis aspirin yang diberikan pada tikus dengan berat 200 gram adalah  $0,018 \times 5.000 = 90$  mg. Sediaan aspirin yang digunakan adalah aspirin tablet 500 mg. Aspirin tersebut dihancurkan dengan cara digerus dan dilarutkan dalam 5,5 mL aquadest. Jadi dalam 1 mL larutan terdapat 90 mg aspirin. Diberikan peroral satu kali sehari pada pagi hari sebelum pemberian pakan standar.

#### 3.5.2 Prosedur Pemberian Ekstrak Kulit Pisang Kepok

Dosis ekstrak kulit pisang kepok yang efektif digunakan pada tikus adalah 250mg/kgBB (Nirmala *et al*, 2012). Hasil penelitian inilah yang mendasari penggunaan 3 dosis ekstrak kulit pisang yaitu 125 mg/kgBB, 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB.

Jadi perhitungan dosis untuk tikus dengan berat 200 g adalah  
200 g berat tikus = 0,2 kg.

Dosis untuk kelompok tiga :  $125 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 25 \text{ mg}$ .

Dosis untuk kelompok empat :  $250 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 50 \text{ mg}$ .

Dosis untuk kelompok lima :  $500 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg} = 100 \text{ mg}$ .

Pembuatan ekstrak kulit pisang kepok menggunakan dua kilogram kulit pisang kepok dipotong-potong lalu dikeringkan di dalam oven selama 24 jam. Kulit-kulit ini kemudian direndam dalam EtOH selama 24 jam. Setelah itu rendaman diuapkan, hasilnya berupa ekstrak etanol kasar. Dari dua kilogram kulit pisang diperoleh sekitar 150 mL ekstrak yang telah diencerkan. Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol kasar pada kulit pisang matang, karena berdasarkan uji *in vitro*, ekstrak etanol kasar dan kulit pisang matang memiliki aktivitas antioksidan yang tertinggi.

### 3.5.3 Prosedur Perlakuan

1. Tikus sebanyak 25 ekor dikelompokkan dalam 5 kelompok.

Kelompok I sebagai kelompok kontrol normal, dimana hanya akan diberi akuades. Kelompok II sebagai kontrol positif yang diberikan aspirin dengan dosis 90 mg. Kelompok III adalah kelompok perlakuan coba dengan pemberian ekstrak kulit pisang kepok dosis 25 mg, kelompok IV diberikan ekstrak kulit pisang kepok dengan dosis 50 mg, dan kelompok V diberikan ekstrak kulit pisang kepok dengan dosis 100 mg. Ekstrak kulit pisang kepok diberikan setelah 2 jam induksi aspirin dosis 90 mg. Masing-masing perlakuan diberikan secara per oral selama 14 hari. Selama 1 minggu tiap-tiap kelompok tikus diadaptasikan sebelum diberi perlakuan.

2. Ukur Berat Badan (BB) tikus sebelum perlakuan.

3. Mencekoki tikus dengan aspirin dan ekstrak kulit pisang kepok selama 14 hari. Tikus tetap diberikan makan *ad libitum*.
4. Setelah dihentikan, 5 tikus jantan dari tiap kelompok dianestesi dengan *Ketamine-xylazine* 75-100 mg/kg + 5-10 mg/kg secara IP kemudian tikus di *euthanasia* berdasarkan *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) menggunakan metode *cervical dislocation* dengan cara ibu jari dan jari telunjuk ditempatkan dikedua sisi leher di dasar tengkorak atau batang ditekankan ke dasar tengkorak. Dengan tangan lainnya, pada pangkal ekor atau kaki belakang dengan cepat ditarik sehingga menyebabkan pemisahan antara tulang leher dan tengkorak.
5. Setelah tikus dipastikan mati, dilakukan laparotomi, ginjal tikus diambil untuk sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnaan HE.
6. Sampel ginjal difiksasi dengan formalin 10%
7. Teknik pembuatan preparat histopatologi
  - a. *Fixation*

Menfiksasi spesimen berupa potongan organ ginjal yang telah dipilih segera dengan larutan pengawet formalin 10%. Cuci dengan air mengalir.
  - b. *Trimming*

Mengecilkan organ kurang lebih 3 mm. Lalu, masukkan organ ginjal ke dalam *embedding cassette*.

c. *Dehydration*

Bersihkan air dengan menggunakan kertas tisu pada *embedding cassette*. Dilakukan perendaman organ ginjal berturut-turut dengan alkohol 70%, 96%, absolute I, II, III masing-masing selama satu jam.

d. *Clearing*

Bersihkan alkohol dengan menggunakan xilol I, II, III masing-masing 30 menit.

e. *Impregnasi*

Impregnasi dengan menggunakan paraffin I dan II masing-masing selama satu jam dalam inkubator dengan suhu 65,1 derajat celcius.

f. *Embedding*

Tuang paraffin dalam pan, pindahkan satu per satu *embedding cassette* ke dasar pan. Lepaskan paraffin yang berisi ginjal dari pan dengan memasukkan ke dalam suhu 4-6 derajat celcius selama beberapa saat. Potong paraffin sesuai dengan letak jaringan dengan menggunakan *scalpel*/pisau hangat. Letakkan pada balok kayu, ratakan pinggirnya dan buat ujungnya sedikit meruncing. Blok paraffin siap dipotong dengan mikrotom.

g. *Cutting*

Sebelum memotong, dinginkan blok terlebih dahulu. Lakukan potongan kasar lanjutkan potongan halus sebesar 4-5 mikron. Pilih lembaran potongan yang paling baik, apungkan pada air

dan hilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing. Pindahkan lembaran jaringan ke dalam *water bath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna. Dengan gerakan menyendok, ambil lembaran jaringan tersebut dengan *slide* bersih dan tempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah, cegah jangan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan. Keringkan *slide*, jika *slide* sudah kering, panaskan untuk meratakan jaringan dan sisa paraffin mencair sebelum pewarnaan.

h. Pewarnaan dengan *Harris Hematoxylin Eosin*

Setelah jaringan melekat sempurna pada slide, pilih slide yang terbaik secara berurutan masukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut:

Untuk pewarnaan, zat kimia pertama yang digunakan adalah xylol I, II, III selama 5 menit. Kedua, zat kimia yang digunakan adalah alkohol absolute I, II, III masing-masing selama 5 menit. Zat kimia yang ketiga adalah aquadest selama 1 menit. Keempat, potongan organ dimasukkan ke dalam zat warna *Harris Hematoxylin Eosin* selama 20 menit. Kemudian memasukkan potongan organ ginjal dalam aquadest selama 1 menit dengan sedikit menggoyang-goyangkan organ. Keenam, mencelupkan organ dalam asam alkohol 2-3 celupan. Ketujuh, dibersihkan dalam aquadest bertingkat masing-masing 1 dan 15



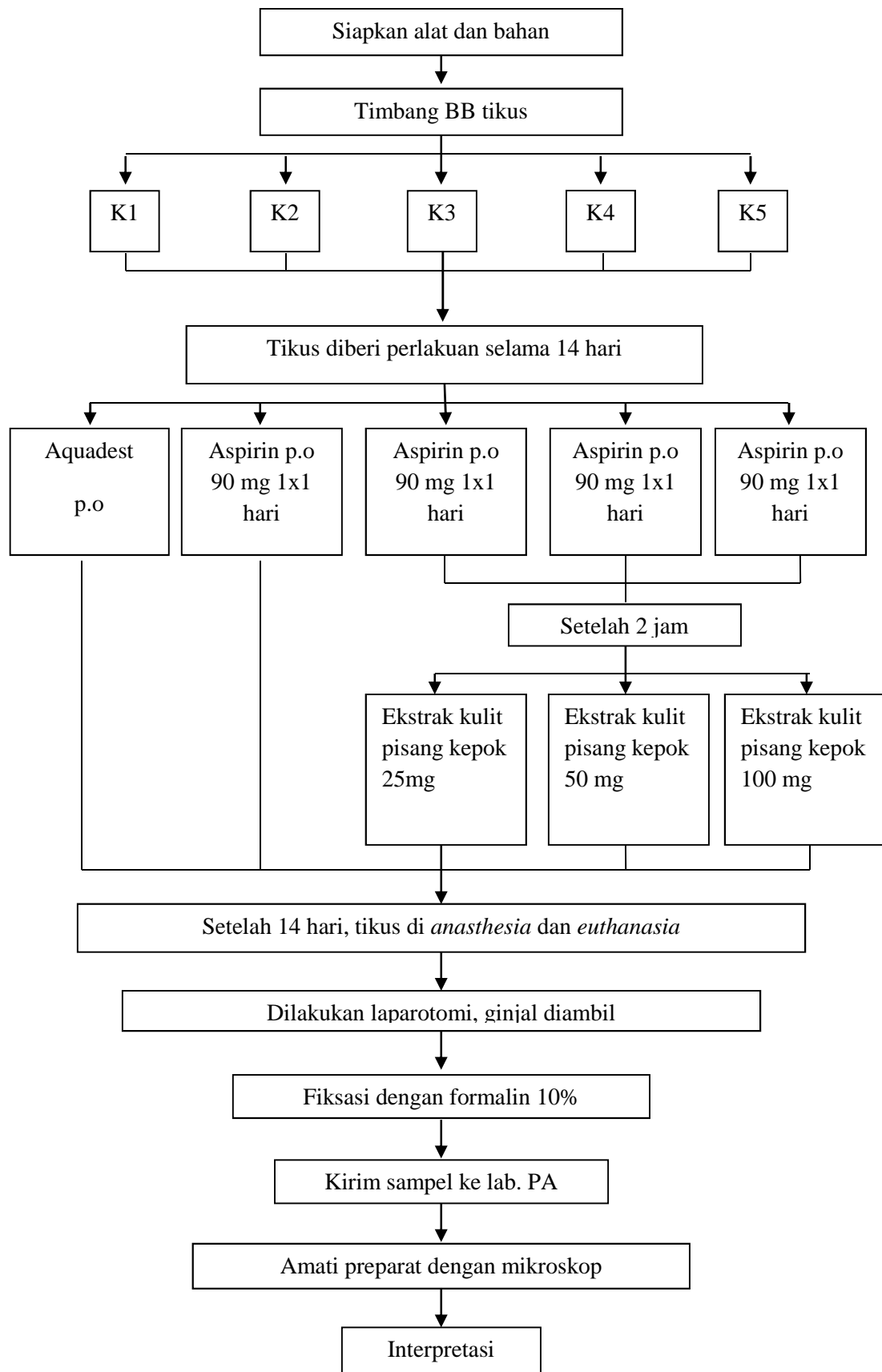
menit. Kedelapan, memasukkan potongan organ dalam eosin selama 2 menit. Kesembilan, secara berurutan memasukkan potongan organ dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 96%, alkohol absolut III dan IV masing-masing selama 3 menit. Terakhir, memasukkan kedalam Xylol IV dan V masing-masing selama 5 menit.

i. *Mounting*

Setelah pewarnaan selesai menempatkan slide diatas kertas tissue pada tempat datar, menetes dengan bahan mounting yaitu kanada balsam dan ditutup dengan cover glass, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

j. Pembacaan Slide

Slide diperiksa di Laboratorium Histologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x dengan satu lapangan pandang.



**Gambar 6.** Alur Penelitian

### 3.6 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

#### 3.6.1 Identifikasi Variabel

##### a. Variabel Independen

1. Perlakuan coba: pemberian ekstrak kulit pisang kepok dan aspirin
2. Perlakuan kontrol negatif: pemberian aspirin tanpa ekstrak kulit pisang kepok

##### b. Variabel Dependen

Variabel dependen adalah kerusakan ginjal.

#### 3.6.2 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel adalah dosis ekstrak kulit pisang kepok dan kerusakan ginjal, serta disajikan dalam tabel 1, sebagai berikut:

**Tabel 1.** Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Skala	Alat Ukur
Dosis ekstrak kulit pisang kepok	Ekstrak kulit pisang diberikan secara oral. Dosis efektif pada penelitian sebelumnya: 125 mg/kgBB, 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB (Nirmala <i>et al</i> , 2012)	Numerik rasio	Sonde oral
Kerusakan ginjal	Sediaan histopatologi dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dalam 1 lapang pandang.	Kategori Ordinal	Mikroskop
	a. Variabel skoring histopatologi untuk kongesti jaringan ginjal 0 : kongesti tidak ada 1 : kongesti setempat (fokal) 2 : kongesti merata (difus)		
	b. Variabel skoring histopatologi untuk perdarahan pada ginjal		

- 
- 0 : perdarahan tidak ada
  - 1 : perdarahan sedikit (ringan)
  - 2 : perdarahan menyebar
  - c. Variabel skoring histopatologi untuk infiltrasi sel radang pada jaringan ginjal
    - 0 : infiltrasi sel radang tidak ada
    - 1 : infiltrasi sel radang sedikit
    - 2 : infiltrasi sel radang menyebar
  - d. Variabel skoring histopatologi untuk nekrosis sel ginjal
    - 0 : nekrosis tidak ada
    - 1 : nekrosis sedikit
    - 2 : nekrosis menyebar
- 

### 3.7 Analisis Data

Analisis data penelitian diproses dengan aplikasi pengolahan data. Dengan tingkat signifikansi  $p=0,05$ . Hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan uji normalitas data (Saphiro-Wilk). Setelah itu dilakukan uji homogenitas dengan uji Levene. Jika varian data distribusi normal serta homogen maka dilanjutkan dengan metode *One Way ANNOVA*. Jika varian data tidak berdistribusi normal maka alternatifnya dipilih uji Kruskal-Wallis. Hipotesis akan dianggap bermakna bila  $p<0.05$ . Jika pada uji ANNOVA menghasilkan nilai  $p<0,05$  maka dilanjutkan dengan analisis *post hoc test*.

### 3.8 Ethical Clearance

Penelitian ini telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dengan menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu: *Replacement*, adalah keperluan memanfaatkan

hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Reduction*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer yaitu  $(n-1) (t-1) = 15$ , dengan  $n$  adalah jumlah kelompok perlakuan. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi (Ridwan, 2013).