

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test-only control group design*. Sebanyak 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* berumur 10–16 minggu yang dipilih secara acak dan dibagi menjadi 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali.

3.2 Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk mengetahui gambaran mikroskopis ginjal. Waktu penelitian selama bulan Agustus–September 2013.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* berumur 10–16 minggu yang diperoleh dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor. Sampel penelitian sebanyak 25 ekor

yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali ($n=5$), sesuai dengan rumus Frederer. Menurut Frederer, rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah:

$$(n-1)(t-1) \ 15$$

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi:

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

$$(n-1)4 \ 15$$

$$(n-1) \ 3,75$$

$$n \ 4,75$$

Jadi sampel yang akan digunakan adalah berdasarkan perhitungan, yaitu sejumlah 5 ekor tikus pada masing-masing kelompok percobaan dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 5 kelompok, sehingga untuk satu tanaman herbal menggunakan 25 ekor tikus putih.

Kriteria inklusi:

1. Sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif);
2. Memiliki berat badan sekitar 100–200 gram;
3. Berusia sekitar 10–16 minggu (dewasa).

Kriteria eksklusi:

1. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, genital);
2. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi dilaboratorium;
3. Mati selama masa pemberian perlakuan.

3.4 Bahan dan Alat Penelitian

3.4.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan ada dua yaitu DMBA dengan dosis 15 mg/200gBB, kemudian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan dosis 100 mg/KgBB, 200 mg/KgBB dan 400 mg/KgBB.

3.4.2 Bahan Kimia

Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi dengan metode *paraffin* meliputi: larutan formalin 10% untuk fiksasi, alkohol 70%, alkohol 96%, alkohol absolut, etanol, *xylol*, pewarna Hematoksilin dan Eosin dan entelan.

3.4.3 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- 1) Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g, untuk menimbang berat tikus;
- 2) *sputit oral* 1 cc, 3 cc dan 5 cc;
- 3) *minor set*;
- 4) kapas dan alkohol;
- 5) *object glass* dan *deck glass*;
- 6) *tissue cassette*;
- 7) *rotarymicrotome*;
- 8) *oven* dan *water bath*;
- 9) *platening table*;
- 10) *autochnicom processor*;
- 11) *staining jar* dan *staining rak*;
- 12) kertas saring;
- 13) *histoplast* dan *parafin dispenser*.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Prosedur Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata Linn*)

3.5.1.1 Metode Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Daun sirsak yang telah dipetik, dicuci terlebih dahulu dengan bilasan air dan dikeringkan selama 10 hari pada suhu ruangan namun tidak terkena cahaya matahari langsung hingga daun mengering. Daun sirsak yang telah kering kemudian diblender sampai halus. Kemudian daun sirsak yang telah diblender halus ditimbang sebanyak 20 gram. Daun yang telah ditimbang, kemudian dimaserasi atau direndam dalam larutan etanol 70% sebanyak 450 mL selama 24 jam. Hasil ekstraksi/maserasi kemudian disaring menggunakan kertas saring Whattman hingga tidak tersisa residu atau padatan. Setelah itu hasil filtrasi diuapkan pelarutnya hingga didapatkan fraksi yang kental menggunakan *rotary evaporator* (Wijaya, 2012).

3.5.1.2 Prosedur Pemberian Dosis Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Dosis pertengahan yang akan digunakan dalam penelitian ini berdasar pada penelitian yang dilakukan oleh Vianandra (2011) adalah 200 mg/kgBB. Dosis pertama ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) diambil dari setengah dosis pertengahan tikus, sedangkan dosis kedua diambil dari

hasil pengalihan 2x dosis pertama dan dosis ketiga diambil dari hasil pengalihan 4x dari dosis pertama atau 2x dari dosis kedua.

a. Dosis untuk tiap tikus pada kelompok 3

$$100 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg (berat badan tikus)} = 20 \text{ mg}$$

b. Dosis untuk tiap tikus pada kelompok 4

$$200 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg (berat badan tikus)} = 40 \text{ mg}$$

c. Dosis untuk tiap tikus pada kelompok 5

$$400 \text{ mg/kgBB} \times 0,2 \text{ kg (berat badan tikus)} = 80 \text{ mg}$$

Volume ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*) diberikan secara oral sebanyak 1 ml yang merupakan volume yang boleh diberikan berdasarkan pada volume normal lambung tikus yaitu 3–5 ml. Jika volume ekstrak melebihi volume lambung, dapat berakibat dilatasi lambung secara akut yang dapat menyebabkan robeknya saluran cerna (Ngatidjan, 2006).

3.5.2 Prosedur Pemberian Dosis DMBA

Dosis DMBA yang diberikan adalah 75 mg/kgBB selama 2 kali pemberian dengan jangka waktu 1 minggu secara intraperitoneal. Cara menghitung dosis DMBA adalah sebagai berikut: misalkan berat badan tikus adalah 200 g, dosis DMBA yang akan diberikan adalah 75 mg/kgBB dan volume maksimal DMBA yang dapat dipajankan pada tikus adalah 1 ml, maka jumlah DMBA yang dibutuhkan adalah

Konsentrasi DMBA=Dosis x Berat Badan/volume pajanan= $0,075 \text{ mg/gBB} \times 200 \text{ g} / 1 \text{ ml} = 15 \text{ mg/ml}$. Maka DMBA yang dibutuhkan untuk membuat 1 ml larutan DMBA dengan dosis 75 mg/kgBB adalah 15 mg.

3.5.3 Prosedur Penelitian

Tikus yang akan dijadikan sampel, dibagi ke dalam 5 kelompok, dimana setiap kelompok berisi 5 ekor tikus. Setiap kelompok kemudian diberi perlakuan sebagai berikut:

- a. Kelompok 1 merupakan kelompok kontrol negatif dengan perlakuan pemberian aquadest dan makanan pelet, satu kali sehari selama 8 minggu.
- b. Kelompok 2 merupakan kelompok kontrol positif dengan perlakuan DMBA, yang dibuat model kanker ginjal dengan pemberian DMBA dalam minyak zaitun dosis 75 mg/kgBB secara intraperitoneal sebanyak dua kali dengan jarak 1 minggu.
- c. Kelompok 3 merupakan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan dosis pemberian 100 mg/kg berat badan selama 4 minggu setelah pemberian DMBA.
- d. Kelompok 4 merupakan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan dosis

pemberian 200 mg/kg berat badan selama 4 minggu setelah pemberian DMBA.

- e. Kelompok 5 merupakan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak dan sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan dosis pemberian 400 mg/kg berat badan selama 4 minggu setelah pemberian DMBA.

Setelah pemberian DMBA yang terakhir, semua tikus diberi pakan kontrol saja hingga akhir pengamatan atau selama 4 minggu. Setelah itu, tikus pada kelompok 3, 4 dan 5 diberi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) sesuai dosis yang dilarutkan dengan aquadest setiap pagi selama 4 minggu. Sementara kelompok kontrol negatif (kelompok 1) maupun kontrol positif (kelompok 2) hanya diberi pakan kontrol dan aquadest.

Setelah minggu ke-9, pengamatan dihentikan kemudian tikus dibius dengan kloroform dan dilakukan pembedahan. Selanjutnya dilakukan pembuatan preparat histopatologi ginjal dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE).

Cara pembuatan sediaan histopatologi yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Lampung adalah sebagai berikut:

- 1) *Fixation*

Spesimen berupa potongan organ ginjal yang telah dipotong secara representatif kemudian segera difiksasi dengan formalin 10%

selama 24 jam, kemudian potongan dicuci dengan air mengalir sebanyak 3–5 kali.

2) *Trimming*

Potongan organ yang terfiksasi dicecilkan hingga ukuran ± 3 mm.

3) Dehidrasi

Dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan air yang terdapat di dalam jaringan. Potongan organ ginjal berturut-turut direndam dalam alkohol 70% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam (2 kali), alkohol absolut selama 1 jam (3 kali).

4) *Clearing*

Clearing bertujuan untuk membersihkan sisa alkohol yang terdapat dalam jaringan. *Clearing* dilakukan dengan memasukan jaringan kedalam larutan *xylol* I dan II, masing-masing selama 1 jam.

5) Impregnasi

Dilakukan menggunakan *paraffin* selama 1 jam dalam oven 65°C.

6) *Embedding*

Sisa *paraffin* yang ada pada base mole dibersihkan dengan memanaskan beberapa saat di atas api dan diusap dengan kapas. *Paraffin* cair disiapkan dengan memasukkan *paraffin* ke dalam cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu diatas 58°C. Kemudian *paraffin* cair dituangkan ke dalam base mole. Jaringan yang telah diimpreg dipindahkan satu persatu dari *tissue cassette* ke dasar base mole dengan mengatur jarak yang satu

dengan yang lainnya. Biarkan membeku kemudian lepaskan *tissue cassette* dari *base mole*. Blok parafin telah siap dipotong dengan mikrotom.

7) *Cutting*

Sebelum dipotong, blok didinginkan terlebih dahulu di lemari es. Dilakukan pemotongan kasar, lalu dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4–5 mikron. Pemotongan dilakukan menggunakan *rotary microtome* dengan *disposable knife*. Kemudian dipilih lembaran potongan yang paling baik, diapungkan pada air dan dihilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing. Lembaran jaringan dipindahkan ke dalam *water bath* pada suhu 60°C selama beberapa detik sampai mengembang sempurna. Dengan gerakan menyendok, lembaran jaringan tersebut diambil dengan *slide* bersih dan ditempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah. *Slide* yang berisi jaringan ditempatkan pada inkubator (suhu 37°C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

8) *Staining* (pewarnaan) dengan *Harris Hematoxylin Eosin*

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, memilih *slide* yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia. Untuk pewarnaan, zat kimia yang pertama digunakan *xylol* I, II, III masing-masing selama 5 menit. Kedua, zat kimia yang

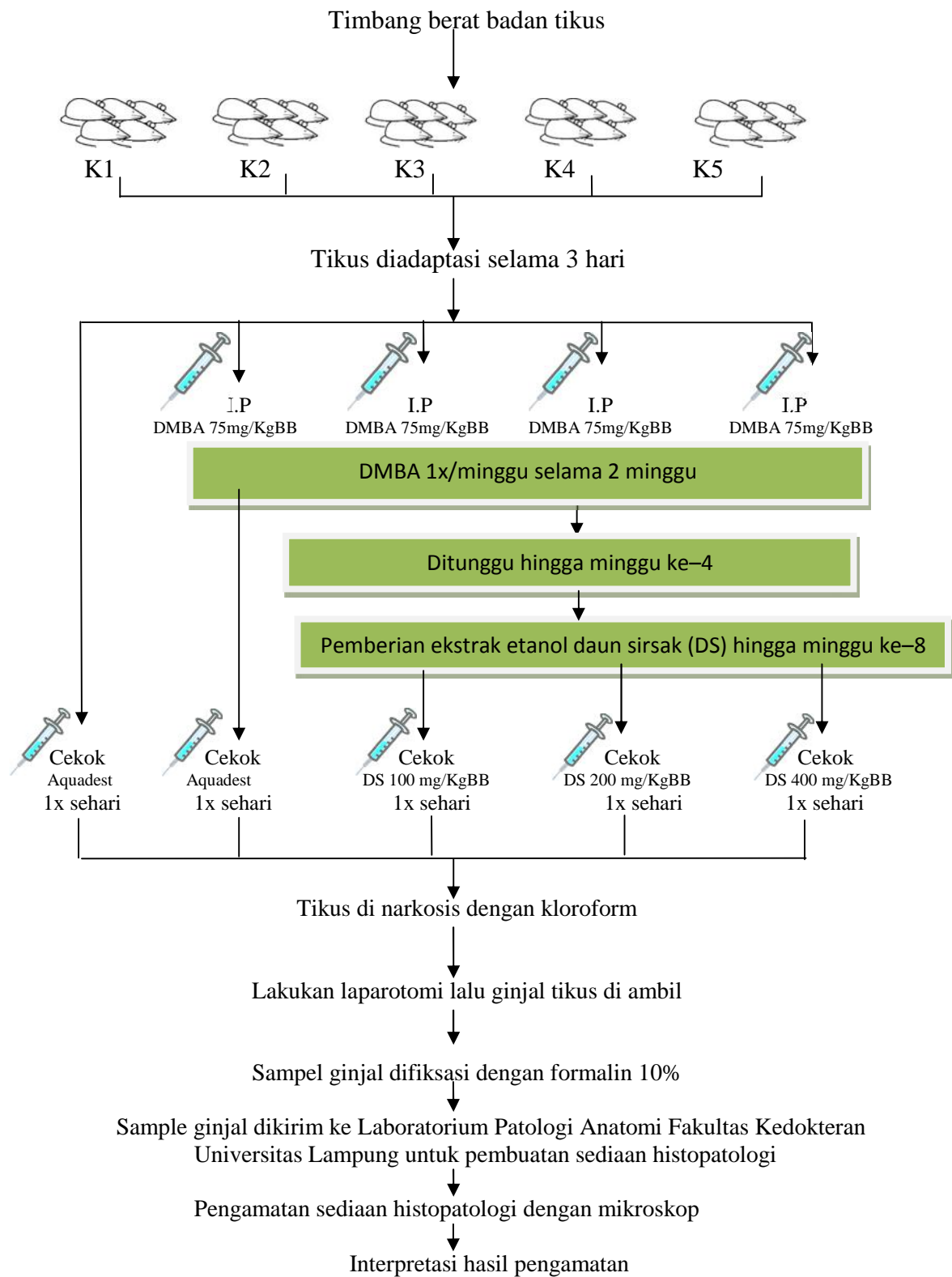
digunakan Alkohol absolut I, II, III masing-masing selama 5 menit. Zat kimia yang ketiga aquadest selama 1 menit. Keempat, potongan organ di masukkan dalam zat warna *Harris Hematoxylin* selama 20 menit. Kemudian memasukkan potongan organ dalam Eosin selama 2 menit. Secara berurutan memasukkan potongan organ dalam alkohol 96% selama 2 menit, Alkohol 96%, alkohol absolut III dan IV masing-masing selama 3 menit. Terakhir, memasukkan dalam *xylol* IV dan V masing-masing 5 menit.

9) *Mounting* dengan entelan dan tutup dengan *deck glass*

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

10) Membaca *slide* dengan mikroskop

Slide diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40X dengan 5 lapangan pandang.



Gambar 14. Diagram Alur Penelitian.

3.6 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.6.1. Identifikasi Variabel

Terdapat dua variabel dalam penelitian ini, yaitu:

a. Variabel Independen

Variabel independen adalah Dosis ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) 100 mg/KgBB, 200 mg/KgBB dan 400 mg/KgBB.

b. Variabel Dependen

Variabel dependen adalah gambaran histopatologi ginjal tikus.

3.6.2. Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas, maka dibuat definisi operasional sebagai berikut

Tabel 2. Definisi Operasional.

Variabel	Definisi	Skala
Dosis ekstrak etanol daun sirsak	<p>Dosis efektif tengah ekstrak etanol daun sirsak adalah 200 mg/KgBB.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kelompok I (kontrol negatif)=pemberian aquadest • Kelompok II (kontrol positif)=pemberian DMBA 75 mg/KgBB • Kelompok III (perlakuan coba)=pemberian ekstrak etanol daun sirsak 100 mg/KgBB +DMBA 75 mg/KgBB. • Kelompok IV (perlakuan coba)=pemberian ekstrak etanol daun sirsak 200 mg/KgBB +DMBA 75 mg/KgBB • Kelompok V (perlakuan coba)=pemberian ekstrak etanol daun sirsak 400 mg/KgBB +DMBA 75 mg/KgBB. 	Numerik
Gambaran histopatologi ginjal tikus	<p>Gambaran kerusakan ginjal tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x pada 10 lapang pandang, kerusakan ginjal ditandai dengan adanya proliferasi sel, pembengkakan sel, dilatasi pembuluh darah, perdarahan. kerusakan tiap lapangan pandang dijumlahkan dan dirata-ratakan.</p> <p>0=Sel dalam batas normal tampak sel berbentuk poligonal, sitoplasma berwarna merah homogen, dinding sel berbatas tegas</p> <p>1=Sel mengalami proliferasi, kerusakan epitel tubulus.</p> <p>2=Sel mengalami proliferasi dan dilatasi tubulus,</p> <p>3=Sel mengalami proliferasi, dilatasi tubulus, edema sitoplasma dan perdarahan.</p>	Numerik

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histopatologi di bawah mikroskop diuji analisis statistik menggunakan *software* statistik. langkah-langkahnya sebagai berikut:

1. Uji normalitas Data ($p > 0,05$)

Pengujian normalitas data menggunakan *Shapiro Wilk test* untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak normal. Hasil uji normalitas ini untuk menentukan analisis berikutnya, yaitu analisis parametrik bila data berdistribusi normal atau non parametrik bila data tidak berdistribusi normal.

2. Uji Homogenitas data ($p > 0,05$)

Pengujian homogenitas data menggunakan uji *Levene's* untuk mengetahui data homogen atau tidak homogen. Hasil uji homogenitas ini untuk menentukan analisis berikutnya, yaitu analisis parametrik bila data homogen atau non parametrik bila data tidak homogen.

3. Uji parametrik (*One-Way ANOVA*)

Untuk menguji perbedaan pengaruh kelompok I, kelompok II, kelompok III, kelompok IV dan kelompok V.

4. Uji non-parametrik (*Kruskal Wallis*)

Untuk menguji perbedaan pengaruh kelompok I, kelompok II, kelompok III, kelompok IV, kelompok V dan merupakan uji alternatif dari *One-Way ANOVA*.

5. Analisis *Post Hoc*

Bila pada uji *One-Way ANOVA* menghasilkan nilai $p < 0,05$.

6. Uji *Mann-Whitney Test*

Bila pada uji *Kruskal Wallis* menghasilkan nilai $p < 0,05$ atau sebagai uji non-parametrik uji T tidak berpasangan.

3.8 Etika Penelitian

Implikasi etik pada hewan, pengelolaan binatang coba pada penelitian ini mengikuti *animal ethics*. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain mengikuti prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu: *replacement*, *reduction*, dan *refinement* (Ridwan, 2013). *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. Dalam hal ini, peneliti tetap menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Spargue Dawley* dan tidak digantikan dengan hewan coba lainnya. *Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi (*humane*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Pada dasarnya prinsip *refinement* berarti membebaskan hewan coba dari beberapa

kondisi. Pertama, bebas dari rasa lapar dan haus, dengan memberikan akses makanan dan air minum yang sesuai dengan jumlah yang memadai baik jumlah dan komposisi nutrisi untuk kesehatannya. Kedua, hewan percobaan bebas dari ketidak-nyamanan, disajikan lingkungan yang bersih dan paling sesuai dengan biologi hewan percobaan yang dipilih, dengan perhatian terhadap: siklus cahaya, suhu, kelembaban lingkungan dan fasilitas fisik seperti ukuran kandang untuk kebebasan bergerak, kebiasaan hewan untuk berkelompok atau menyendiri.