

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode *true experiment* dengan pola *post test-only control group design*. Menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 10–16 minggu yang dipilih secara *random* yang dibagi menjadi 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali, digunakan sebagai subjek penelitian.

3.2 Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) sedangkan pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan selama 2 bulan berada di bulan September–Oktober 2013.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan 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. Untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial, secara sederhana dapat dirumuskan:

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

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

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

$$4n - 4 > 15$$

$$4n > 19$$

$$n > 4,75$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor ($n > 4,75$) dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 5 kelompok sehingga penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih dari populasi yang ada.

Kriteria inklusi:

1. Tikus sehat (penampakan rambut tidak kusam, tidak rontok atau botak dan aktivitas aktif, tidak keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus dan genital)

2. Memiliki berat badan antara 100–150 gram
3. Jenis kelamin jantan
4. Berusia sekitar ± 10 –16 minggu (dewasa).

Kriteria eksklusi:

1. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium
2. Mati selama pemberian perlakuan.

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan yaitu rifampisin dengan dosis 1g/kgBB dan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB.

3.4.2 Bahan Kimia

Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat histologis dengan metode paraffin meliputi formalin 10% untuk fiksasi, alkohol 40%, alkohol 96%, alkohol absolut, etanol, xylol, pewarna Hematoksilin dan Eosin dan entelan.

3.4.3 Perangkat Penelitian

3.4.3.1. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g, untuk menimbang berat tikus, spuit oral 1cc, 3cc dan 5cc, minor set untuk membedah perut tikus (laparotomi), kandang tikus, mikroskop cahaya, gelas ukur dan pengaduk, mortil dan alu, dan kamera digital.

3.4.3.2. Alat Pembuat Preparat Histopatologi

Alat pembuat preparat histopatologi yang digunakan adalah *object glass, deck glass, tissue cassette, rotarymicrotome, oven, water bath, platening table, autochnicom processor, staining jar, staining rak, kertas saring, histoplast* dan *parafin dispenser*.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1 Prosedur Pemberian Ekstrak Kulit Manggis

3.5.1.1. Metode Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis

Proses pembuatan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dalam penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut. Penelitian ini menggunakan pelarut etanol 40%.

Menurut Sulistianto dkk., (2004), ekstraksi dimulai dari penimbangan buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). Selanjutnya dikeringkan dalam almari pengering, dibuat serbuk dengan menggunakan *blender* atau mesin penyerbuk. Etanol dengan kadar 40% ditambahkan untuk melakukan ekstraksi dari serbuk ini selama kurang lebih 2 (dua) jam kemudian dilanjutkan maserasi selama 24 jam. Setelah masuk ke tahap filtrasi, akan diperoleh filtrat dan residu. Filtrat yang didapatkan akan diteruskan ke tahap evaporasi dengan *Rotary evaporator* pada suhu 40⁰C sehingga akhirnya diperoleh ekstrak.

3.5.1.2. Prosedur Pemberian Dosis Kulit Manggis

Dosis kulit manggis pada eksperimen ini adalah 200 mg/kgBB yang didapat dari dosis penelitian sebelumnya, dimana dosis tersebut mencegah kerusakan sel.

$\begin{aligned} \text{Dosis tikus}(100\text{g}) &= 200\text{mg/kgBB} / 1000 \\ &= 0,2 \text{ mg/gBB} \times 100 = 20 \text{ mg/100gBB} \end{aligned}$
--

Dosis untuk 100 g tikus adalah 20 mg/100gBB. Dalam penelitian ini kelompok kontrol negatif dan kontrol positif tidak diberikan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*). Dosis pertama ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) diambil dari dosis normal 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. Dimana dosis-dosis tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya (Wijaya dkk., 2011).

1) Dosis untuk tiap tikus kelompok III

$$20 \text{ mg}/100\text{gBB}$$

2) Dosis untuk tiap tikus kelompok IV

$$2 \times 20 \text{ mg}/100\text{gBB} = 40 \text{ mg}/100\text{gBB}$$

3) Dosis untuk tiap tikus kelompok V

$$4 \times 20 \text{ mg}/100\text{gBB} = 80 \text{ mg}/100\text{gBB}$$

Volume ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) 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 Rifampisin

Dosis rifampisin yang digunakan dalam penelitian ini adalah 100 mg/100 gBB (Brennan *et al.*, 2008). Pada penelitian sebelumnya didapatkan hasil bahwa dosis tersebut dapat menyebabkan trombositopenia, anemia hemolitik, *transient leucopenia* dan peningkatan *nucleated cell* pada sumsum tulang belakang serta penurunan berat kelenjar timus secara signifikan pada tikus.

Hal ini berarti sebagai berikut :

Pada berat tikus rata-rata sekitar 100 mg atau 0,1 kg maka dosis perekor tikus sebesar :

$885 \text{ mg/kgBB} \times 0,1 \text{ kg} = 0,1 \text{ g} = 88,5 \text{ mg/100gBB}$ dibulatkan menjadi 100 mg/100gBB

Dimana dosis ini diberikan sesuai dengan penelitian sebelumnya (Astuti, 2012).

Jadi dosis toksik minimal adalah 100 mg/100gBB. Dosis rifampisin yang dipilih adalah rifampisin tablet sediaan 600 mg, hal ini dikarenakan pemberian peroral. Rifampisin tablet digerus dan dilarutkan dalam 6 ml aquadest. Jadi dalam 1 ml larutan rifampisin terdapat 100 mg/kgBB.

3.5.2.1. Prosedur Penelitian

- a. Tikus sebanyak 25 ekor, dikelompokkan dalam 5 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol normal, hanya yang diberi aquadest. Kelompok II

sebagai kontrol patologis, diberikan rifampisin dengan dosis 100 mg/100gBB. Kelompok III, IV, V adalah kelompok perlakuan coba dengan pemberian rifampisin dosis 100 mg/100gBB, kemudian selang 2–4 jam dilakukan pemberian ekstrak kulit manggis dosis 20 mg/100gBB untuk kelompok III, kelompok IV dengan dosis kulit manggis sebanyak 40 mg/100gBB dan kelompok V dengan dosis kulit manggis sebanyak 80 mg/100gBB. Pemberian rifampisin dan Ekstrak manggis diberikan secara peroral selama 14 hari.

b. Selanjutnya tikus dilakukan anestesi kemudian didekapitasi dan dilakukan pembedahan.

c. Dilakukan laparotomi untuk mengambil organ ginjal, setelah itu bangkai tikus dimusnahkan dengan cara pembakaran ditempat khusus.

d. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnaan *Hematoksilin Eosin*.

e. Sampel ginjal difiksasi dengan formalin 10%.

f. Teknik pembuatan preparat :

1) *Fixation*

a) Memfiksasi spesimen berupa potongan organ ginjal yang telah dipilih segera dengan larutan pengawet formalin 10%.

b) Mencuci dengan air mengalir.

2) *Trimming*

a) Mengecilkan organ ± 3 mm.

b) Memasukkan potongan organ ginjal tersebut ke dalam *embedding cassette*.

3) Dehidrasi

a) Menuntaskan air dengan meletakkan *embedding cassette* pada kertas tisu.

b) Berturut-turut melakukan perendaman organ ginjal dalam alkohol bertingkat 70%, 96%, alkohol absolut I, II, III masing-masing selama 1 jam.

c) *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan xilol I, II, III masing-masing selama 30 menit.

4) *Impregnasi*

Impregnasi dengan menggunakan paraffin I dan II masing-masing selama 1 jam di dalam inkubator dengan suhu $65,1^{\circ}\text{C}$.

5) *Embedding*

a) Menuangkan paraffin cair dalam pan.

b) Memindahkan satu persatu dari *embedding cassette* ke dasar pan.

c) Melepaskan paraffin yang berisi potongan ginjal dari pan dengan memasukkan ke dalam suhu $4-6^{\circ}\text{C}$ beberapa saat.

- d) Memotong paraffin sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan scalpel/pisau hangat.
- e) Meletakkan pada balok kayu, ratakan pinggirnya dan buat ujungnya sedikit meruncing.
- f) Memblok paraffin siap dipotong dengan mikrotom.

6) *Cutting*

- a) Sebelum memotong, mendinginkan blok terlebih dahulu.
- b) Melakukan pemotongan kasar, dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4–5 mikron.
- c) Memilih lembaran potongan yang paling baik, mengapungkan pada air dan menghilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
- d) Memindahkan lembaran jaringan ke dalam *water bath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
- e) Dengan gerakan menyendok mengambil lembaran jaringan tersebut dengan *slide* bersih dan menempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah, mencegah jangan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan.
- f) Mengeringkan slide. Jika sudah kering, slide dipanaskan untuk merekatkan jaringan dan sisa paraffin mencair sebelum pewarnaan.

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

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, memilih *slide* yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut:

Untuk pewarnaan, zat kimia yang pertama digunakan xilol 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 xilol IV dan V masing-masing 5 menit.

7) *Mounting*

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.

g. Pemeriksaan mikroskopis ginjal

Slide diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40X. Pengamatan dilakukan oleh peneliti sendiri atas bimbingan ahli. Gambaran kerusakan ginjal dilihat dari tubulus proksimal yang diambil pada korteks tubulus ginjal. Kerusakan tubulus proksimal ditandai dengan hilangnya inti pada sel tubulus atau disebut sel nekrotik. Skala kerusakan sel kemudian dihitung secara semikuantitatif dalam 10 lapang pandang berbeda. Kriteria kerusakan dihitung sebagai berikut:

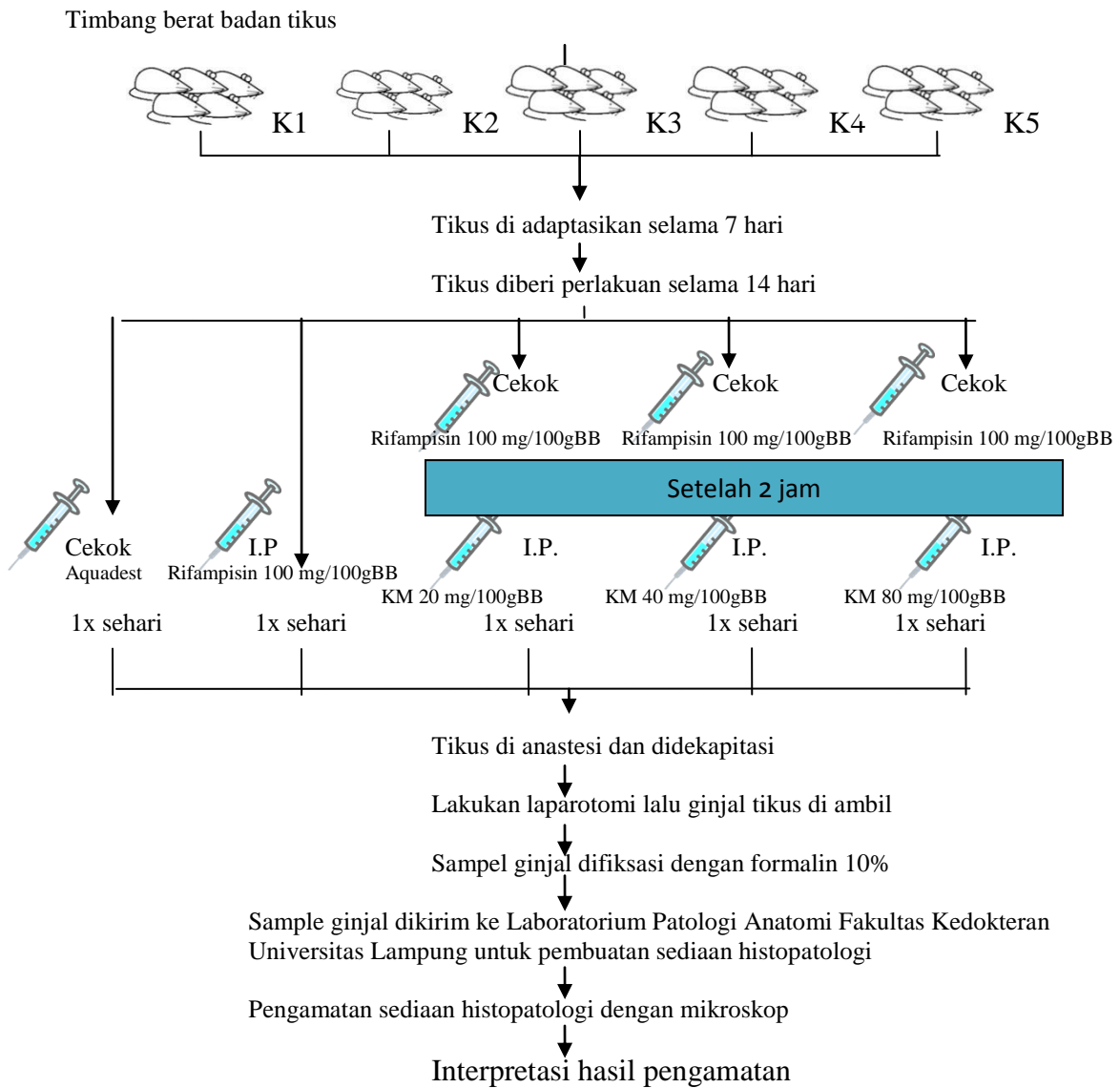
0 = tidak ada sel yang nekrotik

1 = <10% sel yang mengalami nekrotik

2 = 10–33% sel yang mengalami nekrotik

3 = 34–66% sel yang mengalami nekrotik

4 = 67–100% sel yang mengalami nekrotik



Gambar 8. 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

Dosis ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia Mangostana L.*)

b. Variabel Dependen

Gambaran histopatologi ginjal tikus putih (sel tubulus nekrosis) yang diinduksi rifampisin.

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 kulit manggis	Dosis efektif tengah kulit manggis adalah 20 mg/100gBB. Kelompok I (kontrol negatif)= pemberian aquades (dosis manggis 0 mg/100gBB) Kelompok II (kontrol positif)=pemberian rifampisin 1 g/kgBB (dosis manggis 0 mg/100gBB) Kelompok III (perlakuan coba)= pemberian kulit manggis 20 mg/100gBB + rifampisin 100 mg/100gBB Kelompok IV (perlakuan coba)= pemberian kulit manggis 40 mg/100gBB + rifampisin 100 mg/100gBB Kelompok V (perlakuan coba)= pemberian kulit manggis 80 mg/ 100gBB + rifampisin 100 mg/100gBB	Numerik
Gambaran histopatologi ginjal tikus	Gambaran kerusakan tubulus ginjal tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x pada 10 lapang pandang berdasarkan kriteria yang telah disebutkan, kerusakan tubulus ditandai dengan hilangnya inti pada sel tubulus atau disebut sel nekrotik. Persentase sel yang rusak tiap lapangan pandang dijumlahkan dan dirata-ratakan.	Numerik

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histopatologi di bawah mikroskop diuji analisis statistik menggunakan software statistik. Hasil penelitian dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel ≤ 50 . Kemudian, dilakukan uji Levene untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data memiliki varians yang sama atau tidak. Jika varians data berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan metode uji parametrik *one way ANOVA*. Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, digunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*. Hipotesis dianggap bermakna bila $p < 0,050$. Jika pada uji ANOVA atau *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai $p < 0,050$, maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-Hoc* LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

3.6. Etika Penelitian

Implikasi etik pada hewan, pengelolaan binatang pada penelitian ini mengikuti *animal ethic*. Ilmuwan penelitian kesehatan yang menggunakan

model hewan menyepakati bahwa hewan coba yang menderita dan mati untuk kepentingan manusia perlu dijamin kesejahteraannya dan diperlakukan secara manusiawi. Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba, penulis menerapkan protokol penelitian, yaitu: *replacement, reduction dan refinement*.

Replacement adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan pada penelitian ini dengan menggunakan tikus jantan galur *Sparague dawley* 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 diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam hal ini peneliti memakai rumus frederer, dimana rumus ini untuk mencari jumlah minimum dari sample, yang dihitung menggunakan rumus Frederer yaitu $(t-1)(r-1) > 15$, dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan r merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok.

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, dimana peneliti melakukan beberapa perlakuan pada hewan coba. Pertama, bebas dari rasa lapar dan haus, dengan memberikan akses makanan dan air minum yang sesuai dengan jumlah yang memadai baik dari 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 mengelompok atau menyendiri.