

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik.

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Unila. Waktu penelitian selama 42 hari.

#### **C. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi target meliputi tikus putih jantan galur wistar. Populasi terjangkau meliputi tikus putih galur wistar yang berusia 2 bulan dengan berat badan 150-200 yang diperoleh dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALTIVET) Bogor.

##### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan diambil secara acak dari populasi terjangkau yaitu tikus putih jantan galur wistar yang berusia 2 bulan dengan berat badan 150-200 gram yang diperoleh dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALTITET) Bogor. Sampel : jumlah sampel yang digunakan berdasarkan rumus Menurut Federer yaitu :

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

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

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

$$4n > 15 + 4$$

$$n > 4,75$$

Keterangan

k : jumlah kelompok

n : jumlah sampel dalam tiap kelompok

Pada penelitian ini jumlah sampel untuk tiap kelompok sebanyak 5 ekor tikus putih ( $n > 4,75$ ). Jumlah kelompok mencit ada 5 sehingga penelitian ini membutuhkan 25 ekor mencit dari populasi yang ada.

#### **D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi**

Kriteria Inklusi adalah kriteria atau standar yang ditetapkan sebelum penelitian atau penelaahan dilakukan. Sedangkan kriteria eksklusi adalah kriteria pengecualian. Kriteria inklusi dan kriteria eksklusi dalam penelitian ini sebagai berikut :

##### **Kriteria Inklusi :**

1. Sehat
2. Berusia 2 bulan
3. Memiliki berat badan antara 150-200 gram
4. Jenis kelamin jantan

**Kriteria Eksklusi :**

1. Tikus mati saat perlakuan
2. Penampakan rambut kusam, rontok atau botak
3. Perubahan perilaku (tidak doyan makan, lemas, tidak lincah) selama penelitian
4. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium

**E. Alat dan Bahan Penelitian****Alat penelitian**

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

Neraca analitik

1. Sduit oral 1 cc
2. Gunting minor set untuk membedah perut tikus (laparotomi)
3. Kapas dan alkohol
4. Alat untuk pembuatan preparat histopatologi ginjal yaitu mikrotom, cover glass, dan object glass
5. Mikroskop
6. Kandang tikus

**Bahan penelitian**

Tempe yang diperoleh dari penjual tempe pasar Bambu Kuning Bandar Lampung, untuk kemudian dibuat ekstrak tempe. Menurut Sulistianto dkk (2004), tahap awal pembuatan ekstrak tempe adalah melakukan penimbangan tempe. Sebanyak 300 gram tempe dicampur dengan 300ml *n-heksana* (untuk

melarutkan lemak) lalu diblender. Larutan ini dimaserasi sebanyak dua kali selama dua hari sampai larutan tidak berwarna.

Tahap selanjutnya adalah penyaringan dengan kain saring. Endapan yang diperoleh, kemudian dibagi menjadi dua bagian masing- masing 150 gram. Masing- masing bagian dimaserasi dengan pelarut air dan metanol selama dua hari. *Supernatan* yang diperoleh disaring dengan kain saring, kemudian disaring lagi dengan kertas *whitman 42*. Pelarut air dan metanol didalam ekstrak dihilangkan sampai habis melalui *evaporator* pada suhu 50 °C untuk metanol dan 90 °C untuk air menggunakan pompa vakum berkekuatan 750 mmHg. Dari ekstrak ini dibuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 20 % B/V (persen berat per volume, untuk 1% B/V= 1 g/100 mL). Hal tersebut bertujuan untuk memudahkan perhitungan dan pembuatan larutan ekstrak. Untuk pengenceran digunakan *aquadest* yang sesuai dengan konsentrasi ekstrak 20% B/V (Suarsana *et al*, 2006).

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini, berupa bahan kimia yang digunakan untuk pembuatan sediaan histopatologi ginjal tikus. Bahan kimia tersebut adalah formalin 10%, aquades, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol absolut, xylol, *paraffin*, dan bahan pewarna preparat harris Hematoxylin Eosin.

#### **F. Prosedur Penelitian**

Dari data tabel konversi penetapan volume cekok tunggal dari manusia ke hewan uji menurut Laurence dan Bacharach (1964) dan menurut Prof.

Ngatidjan dari Farmakologi UGM diketahui bahwa faktor konversi untuk manusia eropa (70 kg) ke tikus dengan berat 200 gram adalah 0,018, sehingga dosis parasetamol untuk tikus adalah:  $3 \times 18 \text{ mg} / 200 \text{ g tikus} / \text{hari}$  yang diperoleh dari perhitungan ( $0,018 \times 1000 \text{ mg}$ ). Parasetamol 120 mg/ 5 ml, berarti dalam 1 kali pemberian, membutuhkan  $3 \times 0,75 \text{ mL} / 200 \text{ g tikus}$ , sehingga dalam 1 hari, tikus mendapatkan dosis parasetamol sebanyak 2, 25 ml/200 gr/ hari.

### **1. Persiapan penelitian**

Menyiapkan semua alat dan bahan untuk penelitian yang meliputi:

- a. Menyiapkan hewan uji berjumlah 25 ekor umur 2 bulan dengan berat badan 150-200 gram.
- b. Menyiapkan kandang tikus lengkap dengan tempat pakan dan minum.
- c. Menyiapkan parasetamol dan ekstrak tempe untuk perlakuan hewan uji coba secara peroral.

### **2. Perhitungan Dosis Ekstrak Tempe**

Dosis pertengahan ekstrak tempe yang akan digunakan dalam penelitian ini berpedoman pada beberapa hal yaitu dosis yang biasa dikonsumsi manusia per hari yang analognya manusia meminum ekstrak tempe 2 sendok makan per hari, yaitu 30 ml/hari. Berdasarkan faktor konversi manusia Eropa dengan berat badan (70 kg) ke tikus dengan berat badan 200 gr adalah 0,018 (Ngatidjan, 2006), sehingga dosis untuk tikus adalah:  $30 \text{ ml/hari} \times 0,018 = 0,54 \text{ ml/hari}$ . Dibagi menjadi tiga dosis yaitu dosis

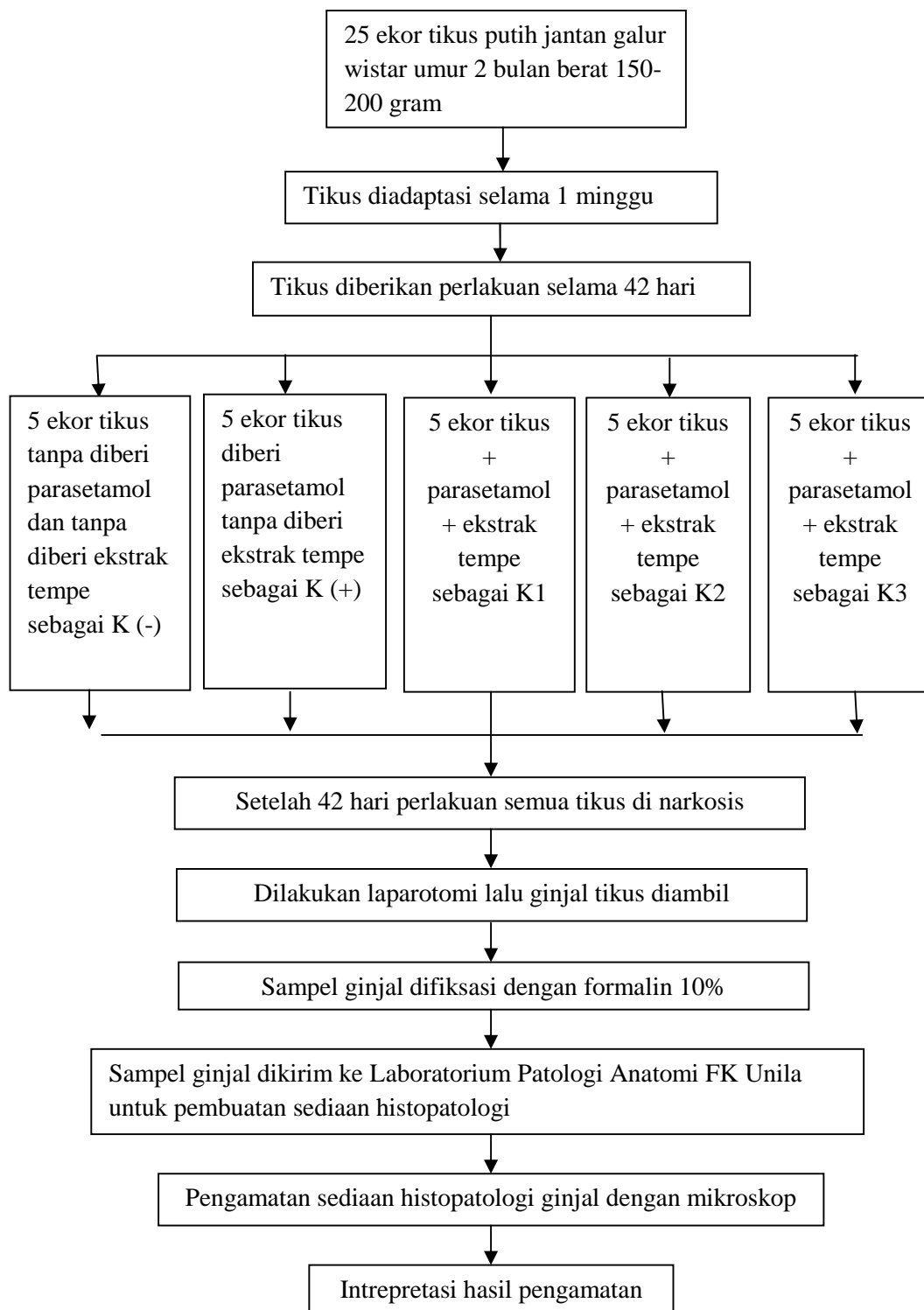
minimal sebesar 0,27 ml/hari, dosis pertengahan 0,54 ml/hari dan dosis maksimal sebesar 1,08 ml/hari.

Ekstrak dibuat dalam konsentrasi 20% B/V yang artinya mengandung 20 g berat ekstrak per 100 ml aquades, sehingga dalam 1 ml aquades mengandung 200 mg ekstrak. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa, dosis minimal adalah 0,27 ml/hari = 54 mg/hari, dosis pertengahan adalah 0,54 ml/hari = 108 mg/hari, dosis maksimal adalah 1,08 ml/hari = 216 mg/hari.

### **3. Pelaksanaan penelitian**

- a. Membagi secara acak 25 ekor tikus menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor.
- b. Menimbang berat badan tikus.
- c. Mengadaptasikan tikus selama seminggu, selama adaptasi tikus diberi makan dan minum 3 kali sehari.
- d. Membuat persediaan ekstrak tempe dan parasetamol.
- e. Menempatkan tikus pada kandang masing-masing, tiap kandang berisi 5 ekor tikus. Kelompok-kelompok tersebut nantinya akan diberi perlakuan sebagai berikut:
  - 1) Kelompok kontrol negatif : Kelompok tanpa pemberian ekstrak tempe dan parasetamol (hewan kontrol).
  - 2) Kelompok kontrol positif : kelompok tanpa pemberian ekstrak tempe, hanya diberi parasetamol 2,25ml/200gr/hari selama 42 hari.

- 3) Kelompok perlakuan I : kelompok yang diberi ekstrak tempe sebanyak 0,27ml/gbb/hari, 1x sehari dan diberi parasetamol sebanyak 2,25ml/200gr/hari selama 42 hari.
- 4) Kelompok perlakuan II : kelompok yang diberi ekstrak tempe sebanyak 0,54ml/gbb/hari, 1x sehari dan diberi parasetamol sebanyak 2,25ml/200gr/hari selama 42 hari.
- 5) Kelompok perlakuan III : kelompok yang diberi ekstrak tempe sebanyak 1,08ml/gbb/hari, 1x sehari dan diberi parasetamol sebanyak 2,25ml/200gr/hari selama 42 hari.
- 6) Setelah 42 hari, perlakuan diberhentikan.
- 7) Lima tikus putih jantan dari tiap kelompok dinarkosis dengan kloroform.
- 8) Dilakukan laparotomi, diambil ginjal untuk dibuat sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode parafin dan pewarnaan hematoxilin eosin. Hematoxilin mempunyai sifat pewarna basa, yaitu memulas unsur jaringan yang basofilik, eosin memulas unsur jaringan yang bersifat asidofilik. Kombinasi ini adalah yang paling banyak digunakan (Junquiera *et al*, 2007).
- 9) Sampel ginjal difiksasi dengan formalin 10%, selanjutnya sampel ini dikirim ke Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk dilakukan pembuatan sediaan mikroskopis jaringan ginjal.



**Gambar 9.** Diagram Pelaksanaan Penelitian



#### **d. Prosedur pembuatan preparat histopatologi ginjal**

Adapun prosedur pembuatan preparat histopatologi ginjal (Akoso *et al*, 1999), yaitu :

##### **1) Fixation**

Spesimen yang akan digunakan dalam pembuatan preparat dimasukkan ke dalam larutan pengawet berupa buffer formalin 10%;

##### **2) Trimming**

Pada tahap trimming, spesimen yang telah difiksasi kemudian dipotong setebal 2-4 mm dan masukkan potongan jaringan tersebut ke dalam embedding cassette. Dalam satu embedding cassette dapat berisi 1-5 buah potongan jaringan disesuaikan dengan ukuran dari besar kecilnya potongan. Setelah itu, cuci dengan air mengalir.

##### **3) Dehydration**

Pada tahap ini dilakukan perendaman jaringan dalam alkohol 80% selama 2 jam. Lalu dilakukan perendaman dalam alkohol 90% selama 2 jam. Setelah itu, dilanjutkan perendaman selama 1 jam dalam alkohol 90%. Kemudian potongan jaringan itu direndam dalam alkohol absolut I selama 1 jam, 1 jam dalam alkohol absolut II, dan 1 jam dalam alkohol absolut III.

##### **4) Clearing**

Pada tahap clearing, dilakukan perendaman potongan jaringan dalam xylol I. Setelah itu, direndam dalam xylol II dan xylol III. Masing-masing perendaman dilakukan selama 1 jam

### 5) Impregnation

Pada tahap impregnation, potongan jaringan diletakkan dalam paraffin I. Kemudian dalam *paraffin* II dan *paraffin* III. Masing-masing dilakukan selama 2 jam.

### 6) Embedding

Pada tahap ini sisa-sisa *paraffin* dibersihkan didalam pan dengan memanaskan pan beberapa saat diatas api dan diusap dengan kapas. Lalu *paraffin* cair disiapkan dengan memasukkan cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu diatas 58<sup>0</sup>C. Kemudian *paraffin* cair dituangkan kedalam pan, satu persatu raingan dipindahkan dari embedding cassette kedasar pan dengan mengatur jarak satu dengan yang lainnya. Setelah itu, pan diapungkan didalam air. Bila pan telah dingin, *paraffin* yang berisi jaringan tersebut dilepaskan dari pan dengan memasukkan kedalam suhu 4-6<sup>0</sup>C beberapa saat. *Paraffin* yang berisi jaringan lalu dipotong sesuai letak jaringan yang ada menggunakan skapel hangat. Selanjutnya, diletakkan pada balok kayu dan pinggirnya diratakan serta ujungnya dibuat sedikit meruncing. Blok *paraffin* siap dipotong dengan mikrotom.

### 7) Cutting

Blok *paraffin* yang telah terbentuk didinginkan terlebih dahulu. Selanjutnya, dilakukan pemotongan blok *paraffin* di ruangan dingin. Dilakukan pemotongan kasar dan dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron. Setelah pemotongan, dipilih lembaran jaringan yang paling baik, kemudian diapungkan didalam air dan

kerutannya dihilangkan dengan cara menekan salah satu sisi lainnya ditarik menggunakan kuas yang runcing. Kemudian lembaran jaringan tersebut dipindahkan ke dalam wadah water bath selama beberapa detik sampai mengembang sempurna. Lembaran jaringan tersebut diambil dengan slide bersih. Ini dilakukan dengan gerakan menyendok. Lalu diletakkan ditengah atau pada sepertiga atas ataupun bawah. Usahakan jangan sampai ada gelembung udara dibawah jaringan.

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

Setelah jaringan melekat sempurna pada slide dipilih yang terbaik. Selanjutnya secara berurutan slide dimasukkan kedalam zat kimia dibawah ini dengan waktu sebagai berikut :

- a) Slide dimasukkan kedalam xylol I, II, III. Masing-masing dilakukan selama 5 menit.
- b) Slide dimasukkan kedalam alkohol absolut I, dan alkohol absolut II. Masing-masing selama 5 menit.
- c) Slide dicuci dengan *aquadest* selama 1 menit.
- d) Tuangkan bahan pewarna preparat Harris hematoxylin selama 20 menit, kemudian dicuci dengan *aquadest* selama 1 menit.
- e) Slide dimasukkan kedalam acid alkohol sebanyak 2-3 celupan. Selanjutnya dimasukkan kedalam *aquadest* selama 1 menit. Lalu slide dicuci dengan *aquadest*.
- f) Celupkan slide kedalam eosin selama 2 menit. Setelah itu, masukkan kedalam alkohol 96% I selama 2 menit, dan alkohol 96% II selama 3 menit. Selanjutnya dicelupkan kedalam alkohol absolut III dan

alkohol absolut IV. Masing-masing dilakukan selama 3 menit.

- g) Celupkan kedalam xylol IV. Lalu kedalam xylol V, masing-masing dilakukan selama 5 menit.

### **9) Mounting**

Setelah proses pewarnaan selesai, slide ditempatkan diatas kertas tissue pada tempat datar. Slide ditetaskan dengan bahan mounting yaitu kanada balsam. Kemudian ditutup dengan cover glass. Lakukan secara hati-hati agar tidak terbentuk gelembung udara dibawah jaringan.

### **10) Pembacaan slide dengan mikroskop**

Slide diperiksa dibawah mikroskop sinar dengan perbesaran 100 kali, 200 kali, atau 400 kali.

## **G. Identifikasi Variabel Penelitian**

### **1. Variabel Independen**

- a) Perlakuan coba : Pemberian perlakuan dengan ekstrak tempe dengan dosis 0,27ml/gbb, 0,54ml/gbb, dan 1,08ml/gbb. Serta pemberian parasetamol 2,25ml/200gr/hari.
- b) Perlakuan kontrol patologis : Pemberian parasetamol 2,25ml/200gr/hari tanpa pemberian ekstrak tempe.
- c) Perlakuan kontrol normal : pemberian akuades

### **2. Variabel Dependen**

Variabel Dependen adalah gambaran histopatologi ginjal tikus putih.

## H. Definisi Operasional

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

**Tabel 2.** Definisi Operasional

NO	VARIABEL	DEFINISI	SKALA
1.	Dosis ekstrak tempe	Dosis ekstrak tempe yang diberikan kepada tikus, yaitu dosis I = 0,27 ml/hari untuk kelompok I, dosis II = 0,54 ml/hari untuk kelompok II, dan dosis III = 1,08ml/hr untuk kelompok III.	Numerik
2.	Parasetamol	Parasetamol yang diberikan dalam satu hari untuk satu ekor tikus sebanyak 2, 25 ml/200 gr/ hari	Numerik
3.	Gambaran histopatologi ginjal	Bagian yang diamati adalah gambaran kerusakan tubulus proksimal ginjal tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x pada 10 lapang pandang. Kerusakan tubulus proksimal ditandai dengan adanya pembengkakan sel. Persentase tubulus proksimal yang rusak tiap lapang pandang dijumlahkan dan dirata-ratakan.	Numerik

## I. Analisis data

Sampel penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok, terdiri dari 1 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan. Data-data yang terkumpul pada tiap-tiap kelompok dianalisis menggunakan program *SPSS 17.0 for Windows* (Sarwono, J., 2010). Tahap pertama dilakukan uji normalitas (uji *Kolmogorov-Sminov* dan uji *Saphiro-Wilk*) dan uji homogenitas terhadap data sel tubulus proksimal ginjal. Jika hasil uji menunjukkan distribusi data adalah

normal dan varians data adalah homogen yang masing-masing hasil uji ditunjukkan oleh nilai  $p$  (*Sig.*)  $> 0,05$ , kemudian dilanjutkan dengan uji *one way ANOVA*. Namun, apabila distribusi data tidak normal dan varians data tidak homogen (tidak memenuhi syarat parametrik) dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Jika hasil uji *one way ANOVA* memberikan nilai  $p$  (*Sig.*)  $< 0,05$ , artinya terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok data penelitian, kemudian dilakukan analisis *Post Hoc LSD (Least Significant Difference)* untuk mengetahui lebih terperinci perbedaan antar kelompok penelitian tersebut, dimana perbedaan bermakna antar kelompok ditentukan oleh nilai  $p$  (*Sig.*)  $< 0,05$ .