

III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan metode rancangan acak lengkap dengan pola *Mann-Whitney*. Penelitian ini menggunakan Tikus Putih (*R. norvegicus*) jantan berumur 3-4 bulan dipilih secara acak menjadi 5 kelompok, digunakan sebagai subjek penelitian.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan selama 14 hari pada bulan Desember 2012. Perhitungan dosis propolis dilakukan di laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, sedangkan tempat penimbangan, pengukuran dan pengamatan secara mikroskopis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*R. norvegicus*) jantan dewasa galur Sprague Dawley berumur 3-4 bulan yang diperoleh dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

A. Klasifikasi Tikus Putih (*R. norvegicus*)

Hewan percobaan yang umum digunakan dalam penelitian ilmiah adalah tikus. Tikus merupakan spesies pertama mamalia yang didomestikasi untuk tujuan ilmiah karena memiliki daya adaptasi yang baik. Tikus yang diproduksi sebagai hewan percobaan dan hewan peliharaan adalah tikus putih (*R. norvegicus*). *R. norvegicus* merupakan salah satu hewan percobaan yang paling sering digunakan dalam penelitian, karena memiliki karakter fungsional yang baik sebagai model bagi hewan mamalia (Hedrich, 2000).

Tabel 2. Klasifikasi tikus putih (*R. norvegicus*) (Myres dan Armitage 2004)

Kingdom	Animalia
Filum	Chordata
Kelas	Mamalia
Ordo	Rodentia
Subordo	Sciurognathi
Famili	Muridae
Sub-Famili	Murinae
Genus	<i>Rattus</i>
Spesies	<i>Rattus norvegicus</i>
Galur/Strain	Sprague Dawley

Sampel penelitian ini di tetapkan berdasarkan rumus Dahlan (2009). Pada uji eksperimental ini, variabel yang diuji adalah numerik tidak berpasangan sehingga perhitungan sampel dihitung dengan rumus:

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(zZ + Zz) S}{x_1 - x_2} \right]^2$$

Dengan deviat baku alfa= Z ; deviat baku beta = Z ; simpangan baku= S dan perbedaan rerata gambaran mikroskopis ginjal diharapkan sebagai $(x_1 - x_2)$.

$$Z = 1,96$$

$$Z = 1,282$$

$$S = 0,459$$

$(x_1 - x_2) = 1$, maka akan didapatkan hasil sebagai berikut:

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(zZ\alpha + Zz\beta) S}{x_1 - x_2} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(1,96 + 1,282) 0,459}{1} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{1,488}{1} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = 2[1,488]^2$$

$$n_1 = n_2 = 4,428$$

Maka jumlah minimal sampel perkelompok dibulatkan adalah 5 ekor tikus per kelompok. Jadi sampel yang akan digunakan adalah berdasarkan perhitungan, yaitu sejumlah 5 ekor tikus pada masing-masing kelompok percobaan. Jadi dalam penelitian ini digunakan 25 ekor tikus.

Kriteria inklusi:

- a. Sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif)
- b. Memiliki berat badan sekitar 200-250 gram
- c. Berjenis kelamin jantan
- d. Berusia sekitar 3-4 bulan

Kriteria eksklusi :

- a. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10 % setelah masa adaptasi di laboratorium.
- b. Mati selama pemberian perlakuan.

D. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan yaitu: etanol 50% v/v dengan dosis 0,01 ml/grBB 1x sehari, larutan propolis dengan dosis 0,00009 ml/grBB 1x sehari, 0,00026 ml/grBB 1x sehari, dan 0,00078 ml/grBB 1x sehari, aquadest, tikus putih jantan dewasa galur Sprague Dawley, pakan dan minum tikus dan larutan chloroform sebagai pembius sebelum tikus di bedah.

2. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah:

- a. Neraca analitik *Mettler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 gr untuk menimbang berat tikus dan ginjal tikus
- b. Pigmomanometer dan timbangan *electronic balance* untuk mengukur berat jenis dan dosis propolis
- c. Sduit oral 1 cc dan 5 cc
- d. Minor set untuk membedah perut tikus (laparotomi)
- e. Kandang tikus
- f. Botol minum tikus
- g. Kapas
- h. Alat untuk membuat preparat histologi (mikrotom, oven, cetakan paraffin)
- i. Alat untuk melihat histologi ginjal (*deck glass, object glass*, mikroskop cahaya)
- j. Larutan NaCl untuk mencuci ginjal Tikus putih setelah dilakukan laparotomi
- k. Tikus Putih (*R. Norvegicus*)

E. Prosedur Penelitian

1. Prosedur Pemberian Dosis Propolis

Propolis yang digunakan dalam penelitian ini adalah propolis dari salah satu merek dagang yaitu Mellia Nature Indonesia (MNI). Penentuan dosis yang diberikan berdasarkan hasil konversi dari manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gr (Ngatidjan, 2006). Angka konversi dari manusia dengan berat badan

70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018. Dosis pemberian propolis pada orang dewasa dengan berat badan 70 kg untuk pencegahan penyakit adalah 1-2 kali/hari 7 tetes. (anonymous, 2012).

1 tetes propolis setara dengan 0,03 mL, jadi 7 tetes propolis setara dengan 0,21 mL. Pada penelitian ini akan menggunakan dosis 2 kali/hari 7 tetes yang setara dengan 0,42 mL propolis.

$$\begin{aligned}
 \text{Dosis tikus} &= 0,042 \text{ mL} \times 70 \text{ kg} \times 0,018 \\
 &= 2,94 \times 0,018 \\
 &= 0,0592/200\text{grBB} \\
 &= 0,00026 \text{ mL/grBB}
 \end{aligned}$$

Dosis propolis pertama dan ketiga ditentukan berdasarkan standar pengobatan herbal ASEAN, yaitu dosis paling rendah adalah 1/3 kali dosis dan dosis paling tinggi adalah 3 kali dosis (Anonymous, 2006).

- a. Untuk kelompok perlakuan I : $1/3 \times 0,00026 \text{ ml/grBB} = 0,00009 \text{ ml/grBB}$ 1x sehari.
- b. Untuk kelompok perlakuan II : $0,00026 \text{ ml/grBB}$ 1x sehari.
- c. Untuk kelompok perlakuan III : $3 \times 0,00026 \text{ ml/grBB} = 0,00078 \text{ ml/grBB}$ 1x sehari.

Jadi, penelitian ini propolis sebanyak 0,00009 ml/grBB 1x sehari, 0,00026 ml/grBB 1x sehari, dan 0,00078 ml/grBB 1x sehari untuk mengetahui adakah efek protektif dari pemberian propolis terhadap ginjal tikus.

2. Prosedur Pemberian Dosis Etanol

Dosis etanol yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan hasil penelitian sebelumnya mengenai pemberian etanol kepada tikus. Menurut penelitian Larasati (2011). Mengenai efek protektif madu terhadap kerusakan hepar tikus yang diinduksi etanol. Dalam penelitian tersebut, tikus Sprague dawley jantan diberikan etanol 50 % (v/v) selama 14 hari dengan dosis 0,01 mL/grBB p.o. Pemberian etanol 50% (v/v) dosis 0,01mL/grBB p.o tersebut menyebabkan sel hati tikus mengalami nekrosis, fibrosis, infiltrasi sel inflamasi, dan degenerasi lemak (Larasati, 2011).

Perhitungan volume pemberian etanol adalah 1 gram etanol sama dengan 1 ml alkohol 100% (Schuckit, 1984). Jadi, jika konsentrasi etanol yang diinginkan 50%, maka dalam 50% v/v 100 ml terdapat 50 gram etanol.

$$\text{Dosis volume etanol tikus} = \frac{5g}{5g} \times 100m = 10 \frac{m}{k}$$

Jadi, setiap tikus diberikan etanol 50% sebanyak 0,01 ml/grBB selama 14 hari 1,5 jam setelah pemberian propolis. Pemberian etanol 1,5 jam setelah pemberian propolis agar lambung tikus telah kosong sehingga mempercepat absorpsi etanol.

3. Prosedur Perlakuan Penelitian

Prosedur perlakuan pada penelitian ini adalah:

- a. Mengukur berat badan tikus sebelum perlakuan
- b. Tikus sebanyak 25 dikelompokkan dalam 5 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol normal, dimana hanya diberikan aquades. Kelompok II sebagai kontrol patologis, dimana diberikan etanol 50% 0,01 ml/grBB 1x sehari. Kelompok III adalah kelompok perlakuan coba dengan dosis pemberian propolis 0,00009 ml/grBB 1x sehari, kelompok IV dengan dosis pemberian propolis 0,00026 ml/grBB 1x sehari, dan kelompok V dengan dosis pemberian propolis 0,00078 ml/grBB 1x sehari. Kemudian selang 1,5 jam kelompok III, IV dan V diberikan induksi etanol 50% sebanyak 0,01 ml/grBB 1x sehari. Masing-masing diberikan secara peroral selama 14 hari
- c. Setelah 14 hari, perlakuan dihentikan
- d. Pada hari ke-15 dinarkosis menggunakan kloroform
- e. Kemudian dilakukan laparotomi, dan ginjal sebelah kanan dan kiri diambil kemudian ditimbang untuk dibuat sediaan mikroskopik dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksilin Eosin
- f. Sampel ginjal tersebut kemudian difiksasi dengan formalin 10%. Selanjutnya sampel ini di kirim ke lab patologi anatomi fakultas kedokteran Unila untuk pembuatan sediaan mikrokopis jaringan ginjal

4. Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi (Akoso, 1999)

Adapun prosedur pembuatan preparat histologi, yaitu:

a. *Fixation*

Spesimen yang akan digunakan dalam larutan pengawet berupa buffer formalin 10%

b. *Trimming*

Pada tahap trimming, specimen yang telah difiksasi kemudian dipotong setebal 2-4 mm dan masukkan potongan jaringan disesuaikan dengan ukuran dari besar kecilnya potongan. Setelah itu, cuci dengan air mengalir.

c. *Dehydration*

Pada tahap ini dilakukan perendaman dalam alkohol 95% selama 2 jam. 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

d. *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.

e. *Impregnation*

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

f. *Embedding*

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

g. *Cutting*

Blok paraffin yang telah terbentuk didinginkan terlebih dahulu. Selanjutnya, dilakukan pemotongan blok paraffin di ruangan

dingin. Dilakukan pemotongan kasar dan dilanjutkan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron. Setelah pemotongan, dipilih lembaran jaringan yang paling baik, kemudian diapungkan di dalam air dan kerutannya dihilangkan dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi lainnya ditarik menggunakan kuas yang runcing. Kemudian lembaran jaringan tersebut dipindahkan ke dalam wadah *water bath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna. Lembaran tersebut diambil dengan slide bersih. Prosedur ini dilakukan dengan gerakan menyendok. Lalu diletakan di tengah atau pada sepertiga atas ataupun bawah. Usahakan jangan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan.

h. *Staining* (pewarnaan) dengan Harris Hematoksilin Eosin

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

1. Slide dimasukkan ke dalam xylol I, II, III. Masing-masing dilakukan 5 menit.
2. Slide dimasukkan ke dalam alkohol absolut I, dan alkohol absolut II. Masing-masing selama 5 menit.
3. Slide dicuci dengan aquadest selama 1 menit.

4. Slide dimasukkan dalam bahan pewarna preparat harris hematoksin selama 20 menit, kemudian dicuci dengan aquadest selama 1 menit.
5. Slide dimasukkan ke dalam acid alkohol sebanyak 2-3 celupan. Selanjutnya dimasukkan ke dalam aquadest selama 1 menit. Lalu slide dicuci dengan aquadest.
6. Slide dimasukkan ke dalam eosin selama 2 menit. Setelah itu, dimasukkan ke dalam 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.
7. Slide dicelupkan ke dalam xylol IV. Lalu ke dalam xylol V. Masing-masing dilakukan selama 5 menit.

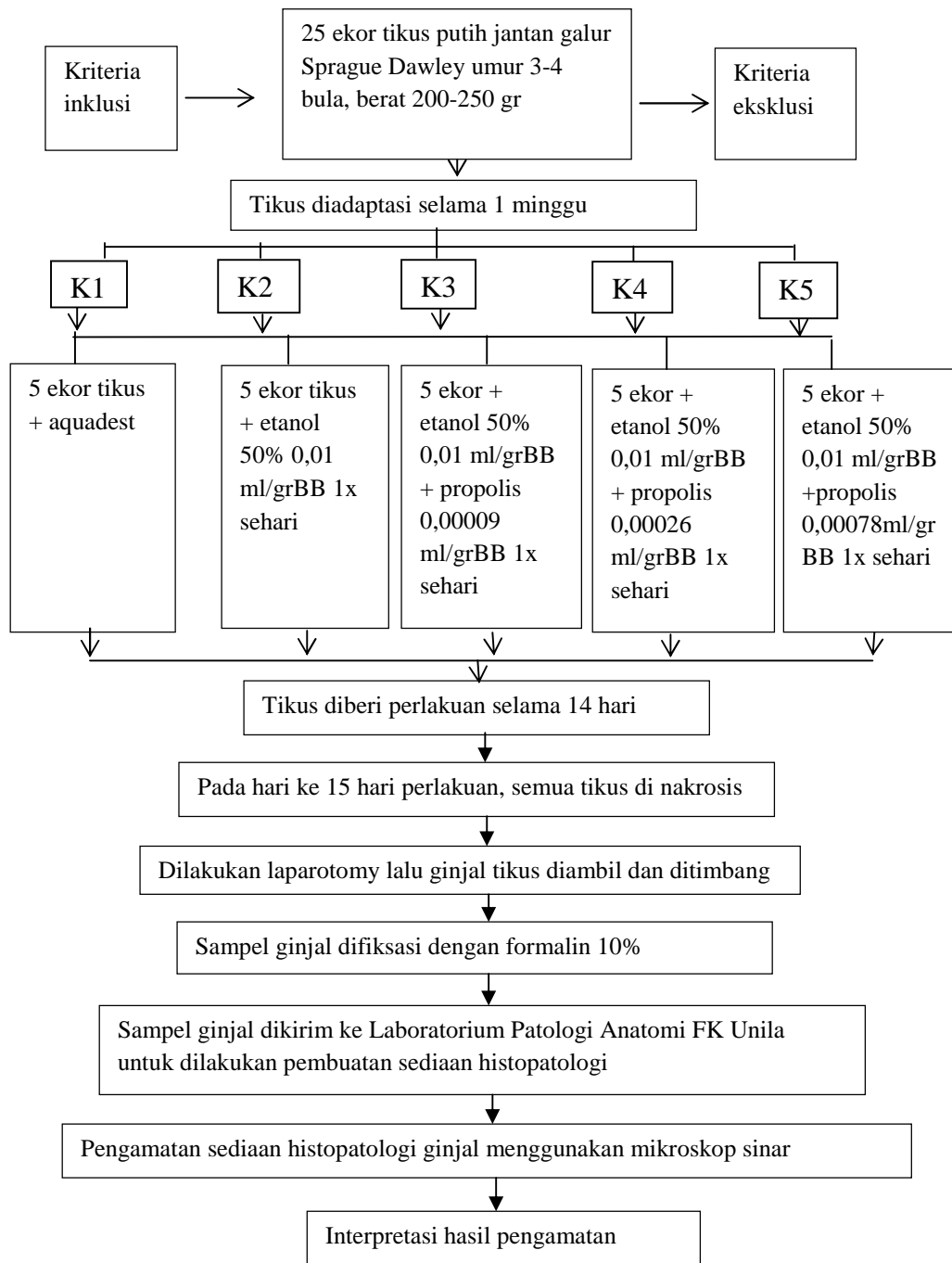
i. *Mounting*

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

j. Pembacaan slide dengan mikroskop

Slide diperiksa di bawah mikroskop sinar dengan pembesaran 100x, dan 400x.

F. Alur penelitian



Gambar 6. Diagram alur penelitian

G. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

a. Variabel Independen

Variabel independen adalah dosis pemberian propolis.

b. Variabel Dependen

Variabel dependen adalah gambaran histopatologi pada ginjal tikus.

2. Definisi Operasional Variabel

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

Tabel 3. Definisi operasional

Variabel	Definisi	Skala
Dosis propolis	<p>Dosis efektif tengah propolis adalah 0,00026 mL/grBB 1x sehari</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kelompok I (kontrol negatif) = pemberian aquades - Kelompok II (kontrol positif) = pemberian etanol 0,01 mL/gr BB 1x sehari - Kelompok III (perlakuan coba) = pemberian propolis 0,00009 mL/grBB + etanol 0,01 mL/grBB 1x sehari - Kelompok IV (perlakuan coba) = pemberian propolis 0,00026 mL/grBB + etanol 0,01 mL/grBB 1x sehari - Kelompok V (perlakuan coba) = pemberian propolis 0,00078 mL/grBB + etanol 0,01 mL/grBB 1x sehari 	Katagorik
Gambaran	Sediaan mikroskopik diamati secara langsung	Numerik
Histopatologi ginjal	<p>Bagian yang diamati adalah perubahan histopatologis ginjal tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x dan 400x pada 10 lapang pandang. Kerusakan tubulus proksimal ditandai dengan adanya pembengkakan sel.</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Normal skor 0. Tidak ada perubahan gambaran histopatologis b. Kerusakan ringan skor 1. Ditemukan adanya pelebaran pada vaskuler ginjal c. Kerusakan sedang skor 2: Ditemukan adanya pelebaran tubulus proksimal d. Kerusakan berat skor 3: Ditemukan adanya kerusakan pada epitel tubulus proksimal <ul style="list-style-type: none"> • Data skor tersebut dibuat rata-rata untuk setiap tikus 	

H. Analisis Data

Hasil penelitian akan 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 data tidak normal homogen atau normal tidak homogen dilakukan transformasi selanjutnya bila didapatkan nilai normal homogen, dilanjutkan dengan metode uji parametrik, apabila ditemukan data tidak normal homogen atau normal tidak homogen, dilakukan uji nonparametrik Kruskal-Wallis. Hipotesis dianggap bermakna bilap $<0,05$. Jika pada uji ANOVA atau Kruskal-Wallis menghasilkan nilai $p <0,05$, maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.