

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode acak terkontrol dengan pola *post test–only control group design*. Menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley berumur 10 sampai 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 *Pet House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, sedangkan pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan selama 10 hari di bulan November 2012.

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. Menurut Dahlan (2009), pada uji eksperimental ini, variabel yang diuji adalah numerik tidak berpasangan sehingga perhitungan sampel dihitung dengan rumus :

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

Dengan kesalahan tipe I = Z ; kesalahan tipe II = 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

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

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

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

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

$$n_1 = n_2 = 4,428$$

Maka jumlah minimal sampel perkelompok di bulatkan adalah 5 ekor tikus per kelompok. Jadi sampel yang akan digunakan adalah berdasarkan perhitungan, yaitu sejumlah 5 ekor tikus pada masing-masing kelompok percobaan.

Kriteria inklusi:

1. Tikus sehat
2. Memiliki berat badan antara 100-150 gram
3. Jenis kelamin jantan
4. Berusia sekitar \pm 10-16 minggu (dewasa)

Kriteria eksklusi:

Tikus sakit dengan penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, dan genital.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan yaitu rifampisin dengan dosis 1 g/kgBB dan ekstrak mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan dosis 7,56 mg/100gBB; 15,12 mg/100gBB; dan 30,24 mg/100gBB.

3.4.2 Bahan Kimia

Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat histologis dengan metode paraffin meliputi formalin 10% untuk fiksasi, alkohol 70%, alkohol 96%, alkohol absolut, etanol, xylol, pewarna Hematoksilin dan Eosin, dan entelan (Fk Unila, 2011).

3.4.3 Alat 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 1 cc, 3 cc, dan 5 cc, 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 gelas objek, gelas dek, jaringan kaset, rotarymicrotom, oven, air, meja platening, *autochinicom* processor, tempat pewarnan, rak pewarnaan, kertas saring, histoplast, dan parafin.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Prosedur Pemberian Ekstrak Buah Mahkota Dewa

3.5.1.1 Metode Pembuatan Ekstrak Buah Mahkota Dewa

Proses pembuatan ekstrak buah mahkota dewa dalam penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut. Penelitian ini menggunakan pelarut etanol, untuk membedakan dengan penelitian sebelumnya oleh Singh dkk., (2009), yang menggunakan pelarut air.

Menurut Sulistianto dkk., (2004), ekstraksi dimulai dari penimbangan daun mahkota dewa. Selanjutnya seluruh bagian tumbuhan dikeringkan dalam almari pengering, dibuat serbuk dengan menggunakan *blender* atau mesin penyerbuk. Etanol dengan kadar 70% 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 40°C sehingga akhirnya diperoleh ekstrak kering.

3.5.1.2 Prosedur Pemberian Dosis Ekstrak Buah Mahkota Dewa

Dosis normal pada manusia adalah 12 mg/kgBB. Angka konversi dari manusia dengan berat badan 70 kg dengan tikus dengan berat badan 200 g adalah 0,018 (Rahmawati, 2006).

$$\begin{aligned} \text{Dosis tikus (200 g)} &= 12 \text{ mg/kgBB} \times 70 \text{ kg} \times 0,018 \\ &= 840 \text{ mg} \times 0,018 = 15,12 \text{ mg/200gBB} \end{aligned}$$

Dosis untuk 100 g tikus adalah 7,56 mg/100gBB. Dalam penelitian ini kelompok kontrol negatif dan kontrol positif tidak diberikan ekstrak mahkota dewa. Dosis mahkota dewa pertama diambil dari dosis normal tikus, sedangkan dosis mahkota dewa kedua diambil dari hasil pengalihan 2x dari dosis pertama.

Sedangkan untuk dosis ketiga diambil dari hasil pengalihan 4x dosis normal atau 2x dari hasil pengalihan dosis kedua. Hal ini memicu pada penelitian yang dilakukan oleh Nurul, Tetri, dan Shanti (2006) bahwa penggunaan dosis 0,033 g ekstrak mahkota dewa mampu menyebabkan efek teratogenik pada tikus bunting selama 10 hari di hari ke-7 hingga 17 pada saat kehamilan.

Untuk kelompok perlakuan I	: 7,56 mg/100gBB
Untuk kelompok perlakuan II	: 2 x 7,56 mg/100gBB = 15,12 mg/100gBB
Untuk kelompok perlakuan III	: 4 x 7,56 mg/100gBB = 30,24 mg/100gBB

Volume ekstrak buah mahkota dewa diberikan secara oral sebanyak 1 ml yang merupakan volume yang boleh diberikan didasarkan pada volume normal lambung tikus adalah 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 berdasarkan dari hasil penelitian sebelumnya diberikan rifampisin 1 g/kgBB per hari. Dosis ini merupakan dosis toksik pada tikus. 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. Selain itu juga rifampisin dengan dosis 1g/kgBB per hari akan menginduksi peningkatan enzim *Cytochrom P-450*, lipid peroksidasi, mutasi

superoxide di hati dan sumsum tulang belakang (Dhuley dan Naik, 1998).

Hal ini berarti sebagai berikut:

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

$$1 \text{ g/kgBB} \times 0,1 \text{ kg} = 0,1 \text{ g} = 100 \text{ mg}$$

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.

3.5.3 Prosedur Penelitian

- a. Tikus sebanyak 35 ekor, dikelompokkan dalam 5 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus yaitu sampel penelitian dan 2 ekor cadangan. Kelompok I sebagai kontrol normal, hanya yang diberi aquadest. Kelompok II sebagai kontrol patologis, diberikan rifampisin dengan dosis 1g/kgBB. Kelompok III adalah kelompok perlakuan coba dengan pemberian ekstrak mahkota dewa dosis 7,56mg/100gBB, kelompok IV dengan dosis mahkota dewa sebanyak 15,12mg/100gBB, dan kelompok V dengan dosis mahkota dewa sebanyak 30,24mg/100gBB. Kemudian selang 2 jam kelompok III, IV dan V diberikan induksi rifampisin sebesar 1g/kgBB. Masing-masing diberikan secara peroral selama 8 hari. Kemudian pada hari ke

- 9 dan 10, masing-masing tikus dari kelompok III, IV dan V tetap diberikan ekstrak mahkota dewa.
- b. Setelah 10 hari, perlakuan dihentikan.
 - c. Selanjutnya tikus dinarkose dengan kloroform dan dilakukan pembedahan.
 - d. Dilakukan laparotomi, ginjal mencit diambil untuk sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksin 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.

4) *Clearing*

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

5) *Impregnasi*

Impregnasi dengan menggunakan paraffin I dan II masing-masing selama 1 jam di dalam inkubator dengan suhu 65,1⁰C.

6) *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 4-6⁰ 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.

7) *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

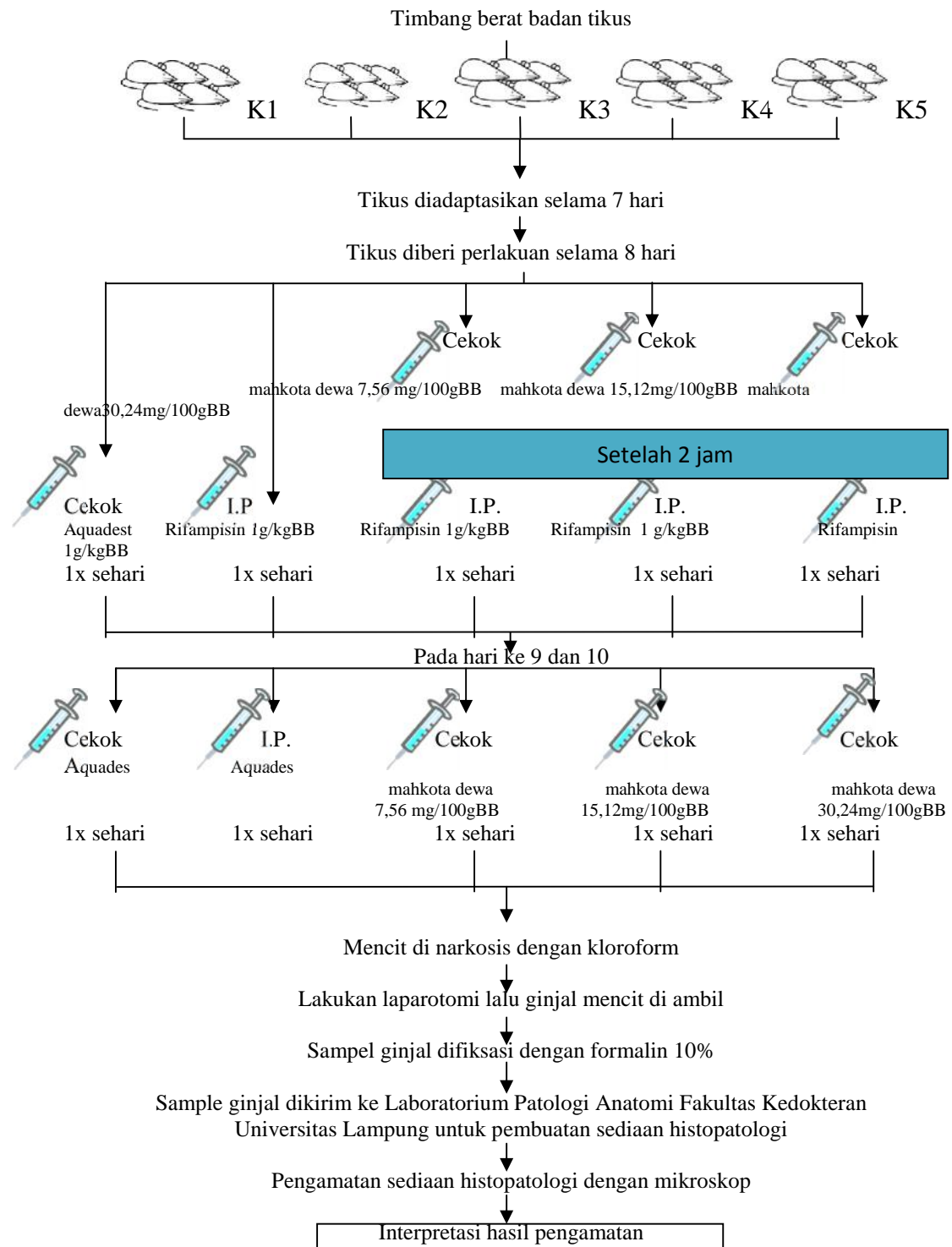
dan IV masing-masing selama 3 menit. Terakhir, memasukan dalam xilol IV dan V masing-masing 5 menit.

8) *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.

9) Membaca *slide* dengan mikroskop

Slide diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40X dengan 10 lapangan pandang.



Gambar 14. Diagram alur penelitian November 2012.

3.6 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.6.1 Identifikasi Variabel

Terdapat dua variabel dalam penelitian ini, yaitu:

1. Variabel independen, adalah dosis pemberian ekstrak mahkota dewa.
2. Variabel dependen, adalah gambaran histopatologis ginjal tikus.

3.6.2 Definisi Operasional Variabel

Tabel 5. Definisi Operasional.

Variabel	Definisi	Skala
Dosis ekstrak buah mahkota dewa	<p>Dosis efektif tengah mahkota dewa adalah 7,56 mg/100gBB.</p> <p>Kelompok I (kontrol negatif) = pemberian aquades</p> <p>Kelompok II (kontrol patologis) = pemberian rifampisin 1 g/kgBB</p> <p>Kelompok III (perlakuan coba) = pemberian mahkota dewa 7,56 mg/100gBB + rifampisin 1g/kgBB</p> <p>Kelompok IV (perlakuan coba) = pemberian mahkota dewa 15,12 mg/100gBB + rifampisin 1g/kgBB</p> <p>Kelompok V (perlakuan coba) = pemberian mahkota dewa 30,24 mg/ 100gBB + rifampisin 1g/kg BB</p>	Numerik
Gambaran histopatologi ginjal tikus	<p>Gambaran kerusakan tubulus proksimal ginjal tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x pada 10 lapang pandang, kerusakan tubulus dan glomerulus. Setiap lapangan pandang dijumlahkan skornya dan dirata-ratakan.</p> <ol style="list-style-type: none"> Skor 0: Normal. Tidak ada tanda akut tubulointertitial nephritis Skor 1: Kerusakan ringan. Ditemukan tanda-tanda oedematus berupa edema interstitial pada sel epitel tubulus dan glomerulus Skor 2: Kerusakan sedang. Ditemukan tanda-tanda perdarahan berupa adanya infiltrasi sel radang akut/kronis, dilatasi pembuluh darah,dan perdarahan Skor 3: Kerusakan berat. Ditemukan adanya tanda-tanda oedematus dan perdarahan pada tubulus dan glomerulus disertai dengan adanya fibrosis interstitial, atrofi tubulus, dan masa pada tubulus. 	Kategorik
Data skor tersebut dibuat rata-rata untuk setiap tikus		

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histopatologi di bawah mikroskop diuji analisis statistik menggunakan program SPSS versi 16.0. 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 analysis of varian* (ANOVA). Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, digunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*. Hipotesis dianggap bermakna bila $p < 0,050$. Jika pada uji *one way ANOVA* atau *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai $p < 0,050$, maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-Hoc* LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.