

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini adalah penelitian di bidang Ilmu Farmakologi, Farmasi dan Patologi Anatomi.

4.2. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di dua tempat, yaitu Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang (UNNES) untuk pengandangan, pemberian pakan, dan perlakuan hewan coba serta Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro (UNDIP) untuk pembuatan preparat histopatologi ginjal. Penelitian dan pengumpulan data pada penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Maret-Juli tahun 2013.

4.3. Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan *post test only controlled group design*. Perlakuan yang diberikan adalah dengan memberikan jus kubis, sedangkan luaran (*outcome*) adalah gambaran makroskopis dan mikroskopis ginjal pada tikus wistar jantan yang diinduksi kuning telur.

4.4. Populasi dan sampel

4.4.1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan. Sampel populasi penelitian didapatkan dari Laboratorium Biologi Fakultas MIPA UNNES.

4.4.2. Sampel

4.4.2.1. Kriteria inklusi

- 1) Tikus galur wistar jantan
- 2) Usia 8-12 minggu
- 3) Berat badan 180-200 gram
- 4) Sehat atau tidak cacat, tingkah laku dan aktivitas tikus normal

4.4.2.2. Kriteria eksklusi

- 1) Berat badan tikus menurun (<160 gram) selama masa adaptasi
- 2) Tikus mati selama masa adaptasi

4.4.3. Cara sampling

Metode pemilihan sampel menggunakan *simple random sampling*.

4.4.4. Besar sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria *World Health Organization* (WHO), yaitu tikus jantan minimal 5 ekor untuk masing-masing kelompok³⁰. Penelitian ini membagi sampel menjadi 4 kelompok, sehingga jumlah tikus total adalah 20 ekor. Masing-masing kelompok ditambah satu ekor tikus, jadi total besar sampel terdapat 24 ekor tikus. Apabila terdapat tikus yang termasuk dalam kriteria eksklusi, diganti

dengan tikus lain yang termasuk dalam kriteria inklusi sehingga jumlah tikus tetap sesuai dengan yang diinginkan.

4.5. Variabel penelitian

4.5.1. Variabel bebas

Jus kubis merupakan variabel bebas pada penelitian ini.

4.5.2. Variabel terikat

Gambaran makroskopis dan mikroskopis ginjal tikus wistar jantan yang diinduksi kuning telur.

4.6. Definisi operasional

Tabel 2. Definisi operasional variabel

| No | Variabel | Unit | Skala | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|---|---------------|-------------------|---------------|----------------------|----------------|--------|----------------------|--------|-----------------|----------------------|------------------|--------|----|---------|
| 1. | <p>Jus kubis</p> <p>Jus yang dibuat dari bahan dasar kubis (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.) seberat 50 gram dipotong terlebih dahulu, kemudian tanpa penambahan air dijus dengan alat <i>juice extractor</i> menghasilkan 25 cc. Diberikan peroral menggunakan sonde lambung kepada kelompok perlakuan, dimana pada kelompok perlakuan 1 sebesar 2,5 ml; kelompok perlakuan 2 sebesar 3,75 ml; kelompok perlakuan 3 sebesar 5 ml. Pemberian dilakukan dalam dua kali pemberian dengan selang waktu satu jam disesuaikan dengan waktu pengosongan lambung tikus, dengan pembagian sebagai berikut:</p> <p>Tabel 3. Pembagian dosis jus kubis</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Kelompok</th> <th>Pemberian pertama</th> <th>Setelah 1 jam</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Kelompok perlakuan 1</td> <td>1,3 ml</td> <td>1,2 ml</td> </tr> <tr> <td>Kelompok perlakuan 2</td> <td>1,9 ml</td> <td>1,85 ml</td> </tr> <tr> <td>Kelompok perlakuan 3</td> <td>2,5 ml</td> <td>2,5 ml</td> </tr> </tbody> </table> | Kelompok | Pemberian pertama | Setelah 1 jam | Kelompok perlakuan 1 | 1,3 ml | 1,2 ml | Kelompok perlakuan 2 | 1,9 ml | 1,85 ml | Kelompok perlakuan 3 | 2,5 ml | 2,5 ml | ml | Rasio |
| Kelompok | Pemberian pertama | Setelah 1 jam | | | | | | | | | | | | | |
| Kelompok perlakuan 1 | 1,3 ml | 1,2 ml | | | | | | | | | | | | | |
| Kelompok perlakuan 2 | 1,9 ml | 1,85 ml | | | | | | | | | | | | | |
| Kelompok perlakuan 3 | 2,5 ml | 2,5 ml | | | | | | | | | | | | | |
| 2. | <p>Tikus</p> <p>Tikus jantan galur wistar umur sekitar 8-12 minggu dengan abnormalitas kadar kolesterol setelah pemberian diet tinggi kolesterol, yaitu dengan induksi kuning telur ayam.</p> | Ekor | Nominal | | | | | | | | | | | | |
| 3. | <p>Gambaran makroskopis ginjal</p> <p>Penilaian normal diberikan jika permukaan ginjal adalah rata dan halus, sedangkan penilaian abnormal diberikan jika terdapat jaringan ikat, kista, abses atau benjolan-benjolan pada permukaan dan/atau parenkim ginjal.</p> <p>Gambaran gambaran makroskopis ginjal diamati dari yang terdapat pada permukaan ginjal. Penilaian gambaran ginjal adalah sebagai berikut:</p> <p>Tabel 4. Skor penilaian gambaran ginjal</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Luas daerah</th> <th>Skor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Normal</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Abnormal < 25%</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Abnormal 26-50%</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Abnormal 51-75%</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Abnormal 76-100%</td> <td>4</td> </tr> </tbody> </table> <p>Skala: kategorikal (ordinal)</p> | Luas daerah | Skor | Normal | 0 | Abnormal < 25% | 1 | Abnormal 26-50% | 2 | Abnormal 51-75% | 3 | Abnormal 76-100% | 4 | | Ordinal |
| Luas daerah | Skor | | | | | | | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | | | | | | | | |
| Abnormal < 25% | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| Abnormal 26-50% | 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| Abnormal 51-75% | 3 | | | | | | | | | | | | | | |
| Abnormal 76-100% | 4 | | | | | | | | | | | | | | |

| | | |
|----|-----------------------------|-------|
| 4. | Gambaran mikroskopis ginjal | Rasio |
|----|-----------------------------|-------|

Penilaian normal diberikan jika tidak ditemukan kelainan ginjal, sedangkan penilaian abnormal diberikan jika terdapat kelainan lumen menutup, *protein cast*, *border brush* (-) atau endapan kristal kalsium oksalat pada lumen *tubulus proximal*. Dibuat preparat dengan pewarnaan *Hematoxilin Eosin* (HE). Diamati pada perbesaran 400x.

4.7. Cara pengumpulan data

4.7.1. Bahan

- 1) Kubis (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)
- 2) Pakan dan minum standar tikus
- 3) Kuning telur ayam

4.7.2. Alat

- 1) Kandang untuk hewan coba
- 2) Sonde lambung
- 3) Timbangan
- 4) Mikroskop
- 5) *Object glass*
- 6) Scalpel
- 7) *Juice extractor*

4.7.3. Jenis data

Gambaran makroskopis dan mikroskopis ginjal tikus wistar jantan yang diinduksi kuning telur setelah pemberian jus kubis merupakan data primer.

4.7.4. Cara kerja

1) Cara pembuatan jus kubis

Kubis (*Brassica oleracea var capitata L.*) segar seberat 50 gram dipotong kemudian dijus dengan menggunakan alat *juice extractor* tanpa penambahan air menghasilkan 25 cc. Jus tersebut akan diberikan secara oral melalui sonde lambung dalam dosis yang bertingkat.

2) Cara pembuatan diet kuning telur ayam

Kuning telur yang sebelumnya telah dipisahkan dari putih telurnya, dibuat emulsi dengan cara mengocok perlahan. Emulsi kuning telur tersebut kemudian ditimbang, diet kuning telur ditentukan sebesar 3-4% berat badan tikus atau sekitar 5 gram (3,5 cc), diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung selama 14 hari³¹.

3) Pemeliharaan dan pemberian pakan hewan coba

Sebelum diberi perlakuan, seluruh sampel diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari, diberi pakan standar dan minum *ad libitum*. Setelah itu, sampel diberi pakan standar dan pakan tinggi kolesterol selama 14 hari. Kemudian seluruh sampel diukur kadar kolesterol darahnya untuk menunjukkan bahwa tikus telah hiperkolesterolemia. Sampel dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing 6 ekor tikus yaitu kelompok kontrol yang diberi pakan standar dan diet kuning telur, kemudian kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 yang diberi pakan standar, diet kuning telur, serta jus kubis selama 14 hari untuk kemudian semua tikus dimatikan dan selanjutnya diambil

ginjalnya dan dilakukan pemeriksaan gambaran makroskopis dan mikroskopisnya kemudian dilakukan pencatatan.

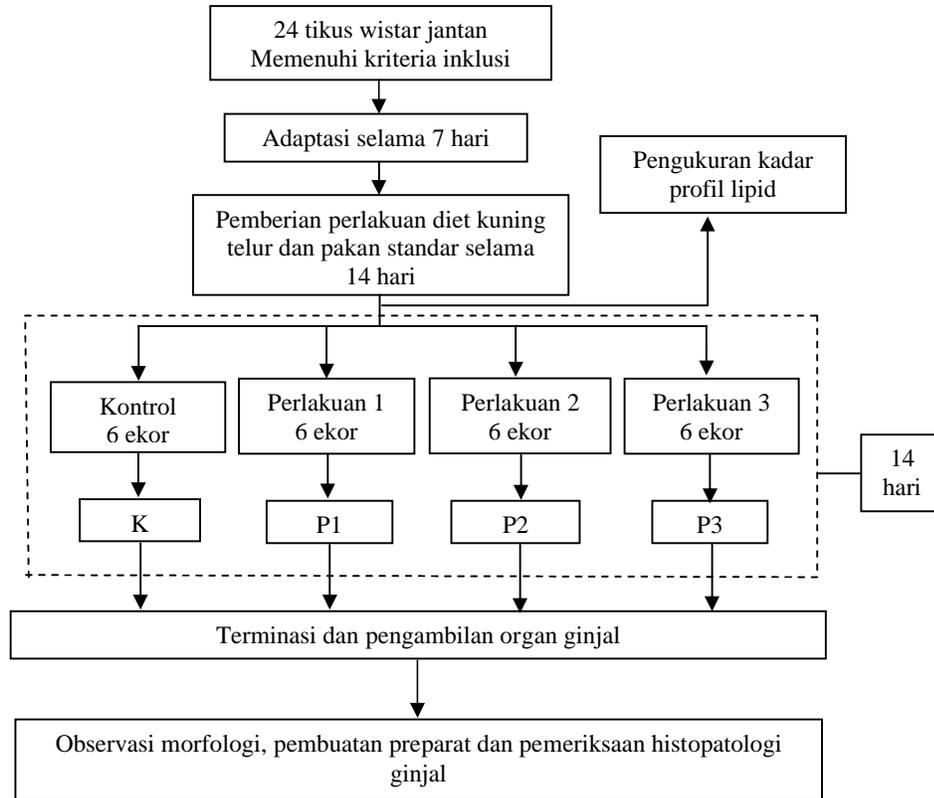
Dosis pemberian didasarkan pada dosis anjuran konsumsi kubis pada laki-laki dewasa selama satu hari yaitu sekitar 315-455 gram. Kemudian dosis ini dikonversi dengan dosis untuk tikus dengan berat badan 200 gram.

Tabel 5. Konversi perhitungan dosis³².

| | Mencit | Tikus | Marmot | Kelinci | Manusia |
|----------------------|--------|--------------|--------|---------|---------|
| Mencit (200 gram) | 1,0 | 7,0 | 12,25 | 27,8 | 387,9 |
| Tikus (200 gram) | 0,14 | 1,0 | 1,74 | 3,9 | 56,0 |
| Marmot (400 gram) | 0,08 | 0,57 | 1,0 | 2,25 | 31,5 |
| Kelinci (1,5 kg) | 0,04 | 0,25 | 0,44 | 1,0 | 14,2 |
| Manusia (70 kg) | 0,0026 | 0,018 | 0,031 | 0,07 | 1,0 |

Berdasarkan tabel tersebut, konversi dosis dari manusia ke tikus adalah 0,018. Perhitungan dosisnya adalah $315 \times 0,018 = 5,67$ gram dan $455 \times 0,018 = 8,19$ gram, sehingga dosis kubis untuk tikus berkisar antara 5,67–8,19 gram. Sedangkan volume maksimal larutan yang dapat diberikan pada tikus secara peroral adalah 5,0 ml/hari, sehingga dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 gram; 7,5 gram; 10 gram yang setara dengan 2,5 ml; 3,75 ml; dan 5ml³³.

4.8. Alur penelitian



Gambar 4. Diagram alur penelitian

Keterangan:

K : Kelompok kontrol (tikus+pakan standar dan minum *ad libitum*+diet kuning telur)

P1 : Kelompok perlakuan 1 (tikus+pakan standar dan minum *ad libitum*+diet kuning telur+jus kubis 2,5 ml/hari)

P2 : Kelompok perlakuan 2 (tikus+pakan standar dan minum *ad libitum*+diet kuning telur+jus kubis 3,75 ml/hari)

P3 : Kelompok perlakuan 3 (tikus+pakan standar dan minum *ad libitum*+diet kuning telur+jus kubis 5 ml/hari)

4.9. Analisis data

Data yang diperoleh telah diolah dengan menggunakan komputer dan dianalisis secara statistik, yaitu untuk melihat pengaruh pemberian jus kubis (rasio) terhadap gambaran mikroskopis ginjal (rasio) dianalisis uji normalitas data *Saphiro-wilk*. Kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas varian dengan menggunakan *Levene test*. Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian jus kubis terhadap gambaran mikroskopis ginjal dianalisis dengan uji beda *Oneway ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji *Post Hoc- LSD*. Hasil dibuat dalam bentuk tabel.

4.10. Etika penelitian

Ethical clearance diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang atau RS. Dr. Kariadi Semarang pada tanggal 4 juni 2013 dengan No. 260/EC/FK/RSDK/2013.

Pada penelitian ini digunakan dua puluh empat ekor tikus wistar jantan, umur 8-12 minggu, dengan berat badan sekitar 120-180 gram, diadaptasi di laboratorium secara berkelompok dan diberi ransum pakan standar selama 2 bulan secara *ad libitum*. Perlakuan diberikan dengan cara disonde. Hewan diterminasi dengan cara dislokasio sendi atlanto occipital, kemudian dikubur oleh tenaga ahli dari Laboratorium Biologi Fakultas MIPA UNNES.

4.11. Jadwal penelitian

Tabel 6. Jadwal Penelitian

| Kegiatan | Bulan 1 | | | | Bulan 2 | | | | Bulan 3 | | | | Bulan 4 | | | | Bulan 5 | | | |
|-----------------------------------|---------|---|---|---|---------|---|---|---|---------|---|---|---|---------|---|---|---|---------|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Studi Literatur | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | |
| Penyusunan proposal | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | |
| Seminar proposal | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | |
| Persiapan peminjaman laboratorium | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | |
| Persiapan alat dan bahan | | | | | | | | | ■ | ■ | | | | | | | | | | |
| Penelitian | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | |
| Analisis data dan evaluasi | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | | |
| Penulisan laporan | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Ujian hasil | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ |