

BAB III

METODE PENELITIAN

3.3 Ruang Lingkup Penelitian

3.1.1 Ruang Lingkup Keilmuan

Pada penelitian ini, ruang lingkup keilmuan yang digunakan adalah Patologi Anatomi, Histologi, dan Farmakologi.

3.1.2 Ruang Lingkup Tempat

Pemeliharaan dan intervensi terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada. Pembuatan dan pengamatan preparat ginjal hewan coba dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP dr. Kariadi Semarang.

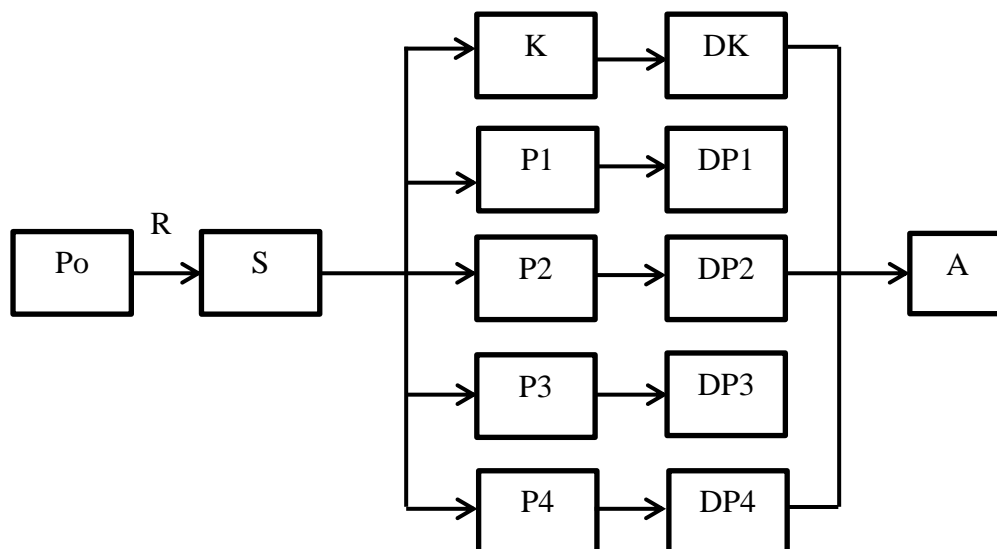
3.1.3 Ruang Lingkup Waktu

Penelitian, pengumpulan, dan analisis data dilakukan dari bulan Maret s/d Mei 2016.

3.4 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *true experimental* dengan *Post Test Only Control Group Design*, yang menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian. Perlakuan berupa pemberian ekstrak daun kersen pada tikus wistar jantan yang diberi etanol dan *soft drink* dengan parameter pengukuran variabel yaitu gambaran mikroskopis ginjal. Penelitian ini tidak diawali dengan

pra tes karena pada penelitian ini pengambilan organ untuk pemeriksaan hanya bisa dilakukan satu kali sehingga tidak memungkinkan untuk dilakukan keduanya.



Gambar 6. Rancangan Penelitian

Keterangan :

Po : Populasi tikus

R : *Simple random sampling*

S : Sampel

K : Kelompok kontrol, tikus Wistar jantan yang diberi pakan standar secara *ad libitum*.

P : Kelompok perlakuan, terdiri dari:

- P1 : Kelompok perlakuan 1, tikus Wistar jantan yang diberi pakan standar secara *ad libitum* dan pemberian etanol 40% per oral dengan dosis 1,8 ml/200g/hari dengan bantuan sonde. Perlakuan 1 dilakukan selama 30 hari berturut-turut.

- P2 : Kelompok perlakuan 2, tikus Wistar jantan yang diberi pakan standar dan pemberian *soft drink* dengan dosis 50 ml/tikus/hari secara *ad libitum* pada pukul 16.00- 08.00 WIB. Selanjutnya, dihitung jumlah *soft drink* yang habis diminum. Perlakuan 2 dilakukan selama 30 hari berturut-turut.
- P3 : Kelompok perlakuan 3, tikus Wistar jantan yang diberi pakan standar secara *ad libitum* dan pemberian ekstrak daun kersen dengan dosis 500 mg/kgBB dengan bantuan sonde. Setelah 60 menit pemberian ekstrak daun kersen, diberikan etanol 40% per oral dengan dosis 1,8 ml/200g/hari dengan bantuan sonde. Perlakuan 3 dilakukan selama 30 hari berturut-turut.
- P4 : Kelompok perlakuan 4, tikus Wistar jantan yang diberi pakan standar secara *ad libitum* dan pemberian ekstrak daun kersen dengan dosis 500 mg/kgBB dengan bantuan sonde pada pukul 15.00 WIB. Setelah 60 menit pemberian ekstrak daun kersen, diberikan *soft drink* dengan dosis 50 ml/tikus/hari secara *ad libitum* pada pukul 16.00-08.00 WIB. Selanjutnya, dihitung jumlah *soft drink* yang habis diminum. Perlakuan 4 dilakukan selama 30 hari berturut-turut.

DK : Data hasil pengamatan histopatologi ginjal tikus K

DP1-DP4 : Data hasil pengamatan histopatologi ginjal tikus P1, P2, P3, dan P4

A : Analisis data

3.5 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Target

Populasi target adalah tikus Wistar jantan.

3.3.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah tikus Wistar jantan yang diperoleh dari LPPT Universitas Gadjah Mada.

3.3.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian diambil dari populasi secara acak dan memenuhi kriteria inklusi, eksklusi, dan *drop out*.

3.3.3.1 Kriteria Inklusi

1. Umur 2 - 3 bulan.
2. Berat badan rata-rata 170-190 gram.
3. Tikus dalam keadaan sehat dan lincah.

3.3.3.2 Kriteria Eksklusi

1. Terdapat kecacatan fisik.

3.3.3.3 Kriteria *Drop out*

1. Mati selama penelitian.

3.3.4 Cara Pengambilan Sampel

Untuk menghindari bias karena variasi faktor umur dan berat badan maka pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*). Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel diambil dari tikus Wistar yang sudah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sehingga dianggap cukup homogen. Semuanya diambil secara acak dari kelompok tikus yang sudah diadaptasi pakan selama satu minggu.

3.3.5 Besar Sampel

Penentuan besar sampel minimal yang digunakan menurut WHO adalah 5 ekor tiap kelompok. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 25 ekor tikus strain Wistar jantan, tiap kelompok masing-masing sejumlah 5 ekor.

Sedangkan untuk mengantisipasi kurangnya jumlah sampel karena dikeluarkannya tikus akibat adanya kriteria *drop out*, maka pada tiap kelompok akan ditambahkan satu ekor tikus sehingga jumlah sampel yang digunakan adalah sebesar 30 ekor.

3.6 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura*), etanol, dan *soft drink*.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran mikroskopis ginjal tikus Wistar jantan.

3.7 Definisi Operasional

Tabel 5. Definisi Operasional Variabel

Jenis Variabel	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala
Bebas	Ekstrak daun kersen (<i>Muntingia calabura</i>)	Ekstrak daun kersen dengan dosis yang mengacu pada penelitian sebelumnya yaitu 500 mg/kgBB yang diberikan 60 menit sebelum pemberian etanol dan <i>soft drink</i> . ²⁴	Nominal
	Etanol	Minuman beralkohol yang mengandung etanol 40% dalam kemasan botol 300 ml. Dosis yang digunakan mengacu pada dosis yang biasa dikonsumsi manusia (100 ml) dan telah dikonversi pada tikus yaitu 1,8 ml/200g/hari.	Nominal
	<i>Soft drink</i>	<i>Soft drink</i> yang mengandung fruktosa 41 gram dalam kemasan botol 425 ml. Dosis yang digunakan mengacu pada penelitian sebelumnya yaitu 50 ml/tikus/ hari. Pemberian <i>soft drink</i> secara <i>ad libitum</i> pada pukul 16.00-	Nominal

		08.00 WIB karena tikus Wistar merupakan hewan nokturnal. ³⁵ Selanjutnya, dihitung jumlah <i>soft drink</i> yang habis diminum. ^{11,25}	
Terikat	Gambaran mikroskopis ginjal tikus Wistar jantan	Gambaran mikroskopis ginjal tikus Wistar jantan yang berupa jumlah kerusakan tubulus (brush border tubulus hilang, vakuolisasi epitel tubulus, dan akumulasi debris dalam lumen tubulus) dinilai setelah dilakukan pengecatan PAS dan diamati dengan mikroskop binokuler dengan pembesaran 400 kali pada lima lapangan pandang.	Ordinal

Tabel 6. Kriteria Pembacaan Derajat Kerusakan Tubulus Ginjal

Kerusakan Tubulus	Skor
0	0
< 5%	1
5 - < 10%	2
10 - < 15%	3
15 - < 20%	4
≥ 20%	5

3.8 Cara Pengumpulan Data

3.6.1 Alat

- 1) Kandang hewan coba
- 2) *Electronic scale*
- 3) Sonde lambung
- 4) Alat bedah hewan percobaan : scapel, pinset, gunting, jarum, dan meja lilin
- 5) Alat untuk pembuatan preparat histologi : mikrotom, oven, dan cetakan parafin
- 6) Alat untuk melihat histopatologik ginjal : deck glass, object glass, dan mikroskop binokuler
- 7) Spuit 3 ml

3.6.2 Bahan

- 1) Pakan dan minuman standar hewan percobaan
- 2) Tikus strain Wistar jantan
- 3) Bahan pembuatan preparat histologi
 - a. Larutan buffer formalin 10%
 - b. Parafin
 - c. Larutan xylol
 - d. Alkohol bertingkat: 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%

4) Bahan pengecatan PAS

a. Reagen *periodic acid*

b. Reagen schiff

c. Alkohol bertingkat: 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%

d. Larutan xylol

e. Canada Balsam / Entellan

f. Albumin meyer

g. Aquadest

5) *Carboxymethylcellulosa* (CMC)

6) Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura*)

7) Minuman beralkohol yang mengandung etanol 40%

8) *Soft drink* yang mengandung fruktosa tinggi dalam kemasan botol 425 ml

9) Ketamin

3.6.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini merupakan data primer. Data diperoleh langsung dari subjek penelitian. Data primer yang dikumpulkan adalah data yang bersumber dari pemeriksaan mikroskopis terhadap organ ginjal tikus Wistar.

3.6.4 Cara Kerja

Cara kerja dalam penelitian ini meliputi langkah-langkah sebagai berikut :

- 1) Sampel diadaptasikan selama satu minggu di laboratorium dan diberi pakan standar.
- 2) Sampel dipilih berdasarkan *simple random sampling*, 30 ekor tikus strain Wistar jantan dibagi dalam lima kelompok.
- 3) Persiapan etanol 40% berdasarkan dosis yang biasa dikonsumsi pada manusia (100 ml) dan telah dikonversi pada tikus yaitu 1,8 ml/200g/hari.
- 4) Persiapan *soft drink* berdasarkan dosis penelitian sebelumnya yaitu 50 ml/tikus/hari secara *ad libitum*.
- 5) Persiapan ekstrak daun kersen dengan dosis 500 mg/kgBB sesuai dengan penelitian sebelumnya.
- 6) Kelompok kontrol, tikus Wistar jantan diberi pakan standar secara *ad libitum* selama 30 hari berturut-turut. Setelah itu, organ ginjal tikus Wistar jantan diambil untuk dilakukan pemeriksaan mikroskopis jaringan.
- 7) Kelompok perlakuan 1, tikus Wistar jantan diberi pakan standar secara *ad libitum* dan pemberian etanol 40% per oral dengan dosis 1,8 ml/200g/hari dengan bantuan sonde selama 30 hari berturut-turut. Setelah itu, organ ginjal tikus Wistar jantan diambil untuk dilakukan pemeriksaan mikroskopis jaringan.
- 8) Kelompok perlakuan 2, tikus Wistar jantan diberi pakan standar dan pemberian *soft drink* dengan dosis 50 ml/tikus/hari secara *ad libitum*

pada pukul 16.00-08.00 WIB. Selanjutnya, dihitung jumlah *soft drink* yang habis diminum. Perlakuan 2 selama 30 hari berturut-turut. Setelah itu, organ ginjal tikus Wistar jantan diambil untuk dilakukan pemeriksaan mikroskopis jaringan.

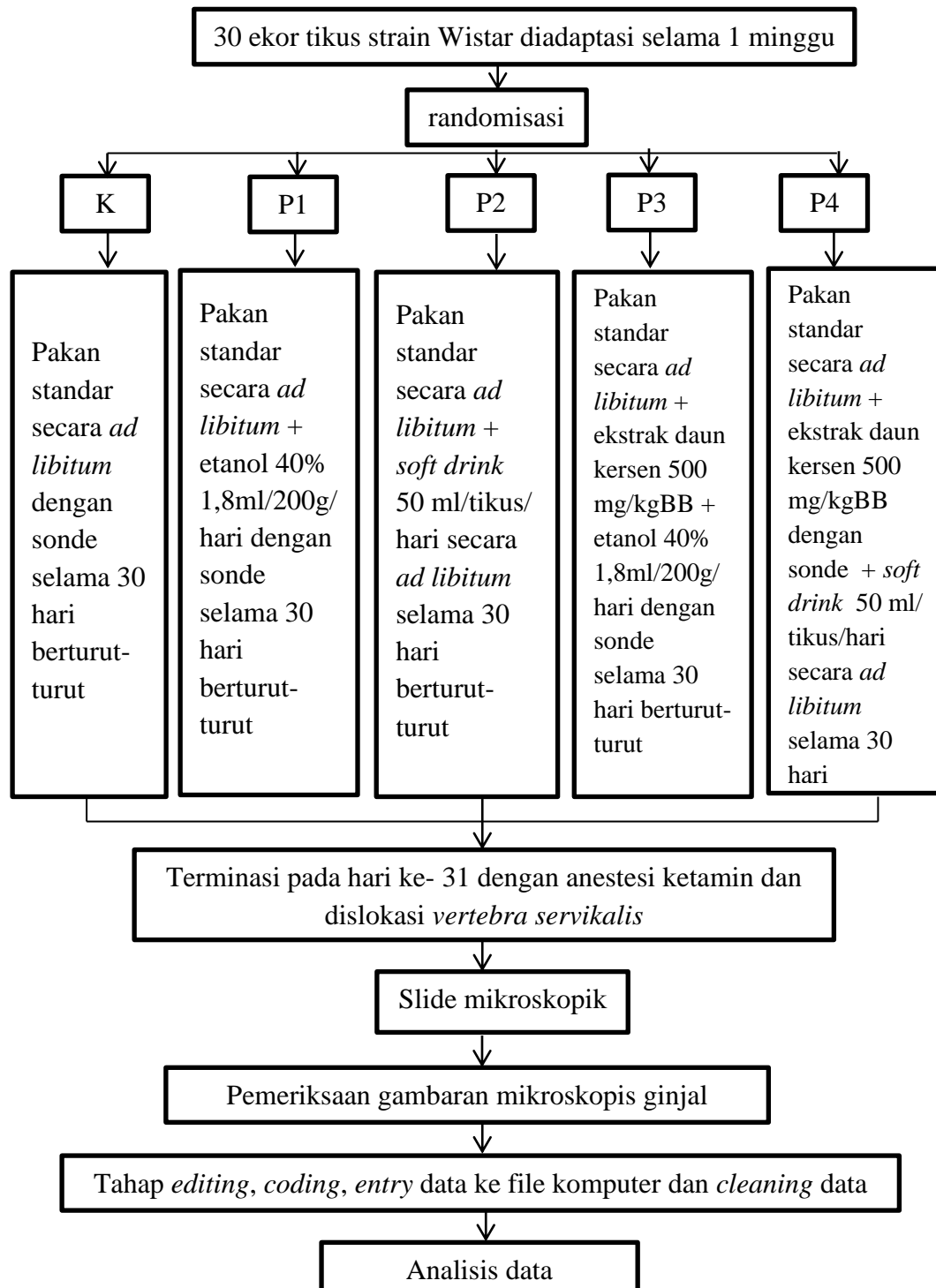
- 9) Kelompok perlakuan 3, tikus Wistar jantan diberi pakan standar secara *ad libitum* dan pemberian ekstrak daun kersen dengan dosis 500 mg/kgBB dengan bantuan sonde. Setelah 60 menit pemberian ekstrak daun kersen, diberikan etanol 40% per oral dengan dosis 1,8 ml/200g/hari dengan bantuan sonde. Perlakuan 3 dilakukan selama 30 hari berturut-turut. Setelah itu, organ ginjal tikus Wistar jantan diambil untuk dilakukan pemeriksaan mikroskopis jaringan.
- 10) Kelompok perlakuan 4, tikus Wistar jantan diberi pakan standar secara *ad libitum* dan pemberian ekstrak daun kersen dengan dosis 500 mg/kgBB dengan bantuan sonde pada pukul 15.00 WIB. Setelah 60 menit pemberian ekstrak daun kersen, diberikan *soft drink* dengan dosis 50 ml/tikus/hari secara *ad libitum* pada pukul 16.00-08.00 WIB. Selanjutnya, dihitung jumlah *soft drink* yang habis diminum. Perlakuan 4 dilakukan selama 30 hari berturut-turut. Setelah itu, organ ginjal tikus Wistar jantan diambil untuk dilakukan pemeriksaan mikroskopis jaringan.
- 11) Pada hari ke- 31 setelah perlakuan selesai diberikan, semua hewan percobaan dimatikan dengan anestesi ketamin dan dislokasi *vertebra servikalis*, kemudian organ ginjal diambil untuk selanjutnya dibuat

preparat histologi dengan metode blok parafin dengan pengecatan PAS.

Hal ini dilakukan pada hari ke- 31 agar efek perlakuan tampak nyata.

- 12) Pemeriksaan histopatologi jaringan ginjal meliputi *processing* dengan pengambilan jaringan dan fiksasi, pemotongan blok, dan pengecatan PAS. Dari setiap sampel ginjal dibuat preparat dan akan dibaca dalam lima lapangan pandang yaitu dari keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan pembesaran 400x serta dianalisis menggunakan mikroskop binokuler untuk dinilai gambaran mikroskopisnya.

3.9 Alur Penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian

3.10 Analisis Data

Data yang diperoleh akan diolah terlebih dahulu melalui proses *editing*, *coding*, *entrying*, dan *cleaning* data lalu dianalisis secara statistik dengan program komputer. Analisis deskriptif hasil penelitian berupa proporsi untuk masing-masing kelompok. Uji hipotesis yang digunakan adalah uji *Kruskal-Wallis* dan jika hasilnya bermakna akan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

3.11 Etika Penelitian

Sebelum dilakukannya penelitian terhadap hewan coba tikus Wistar pada percobaan ini, maka terlebih dahulu telah dimintakan perihal *Ethical Clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dengan nomor 403/EC/FK-RSDK/2016.