

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup pada penelitian ini mencakup bidang ilmu Histologi, Patologi Anatomi, dan Farmakologi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian, pengumpulan dan analisa data dilakukan pada bulan Februari - September 2017.

Penelitian ini akan dilakukan di beberapa tempat antara lain:

- 1) Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk tempat pemeliharaan serta perlakuan hewan coba.
- 2) Laboratorium Sentral Rumah Sakit Nasional Diponegoro untuk pembuatan ekstrak etanol 70% daun kelor (*Moringa oleifera*), pembuatan preparat histopatologi ginjal hewan coba dan untuk melakukan interpretasi hasil mikroskopis ginjal hewan coba.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan tikus wistar sebagai hewan coba.

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Target

Populasi target pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Unit Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya.

3.4.3 Sampel

3.4.3.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus wistar Jantan.
2. Berat badan rata-rata 150-250 gram.
3. Umur 2-3 bulan.
4. Tikus dalam keadaan sehat dan aktif bergerak.
5. Tidak terdapat kelainan anatomi.

3.4.3.2 Kriteria *Drop Out*

- 1) Mati pada saat penelitian berlangsung.
- 2) Perilaku berubah (lemah dan tidak aktif bergerak).

3.4.4 Cara Pengambilan Sampel

Sampling pada penelitian ini dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*) untuk menghindari bias karena variasi faktor umur dan berat badan. Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel yang diambil dari tikus wistar sudah memenuhi kriteria inklusi sehingga dianggap cukup homogen. Semuanya diambil secara acak dari kelompok tikus yang sudah diadaptasi pakan selama 1 minggu.

3.4.5 Besar Sampel

Besar sampel mengacu pada pedoman (*World Health Organization*) WHO mengenai penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental.²⁵ Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan minimal 5 ekor. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 25 ekor tikus strain wistar jantan karena terdapat 5 kelompok, tiap kelompok masing masing berjumlah 5 ekor.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis bertingkat pada hewan coba yang diberikan secara peroral.

3.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah gambaran mikroskopis ginjal tikus wistar yang diinduksi formalin.

3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 1. Definisi Operasional Variabel

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
Bebas	Pemberian ekstrak etanol daun kelor (<i>Moringa oleifera</i>) dan formalin.	Ekstrak daun kelor (<i>Moringa oleifera</i>) menggunakan ekstraksi maserasi multistahap dengan menggunakan etanol. Dosis yang digunakan adalah dosis bertingkat yang diberikan pada kelompok hewan coba perlakuan 1 (P1) dosis 200 mg/kgBB, perlakuan 2 (P2) dosis 400 mg/kgBB, dan perlakuan 3 (P3) dosis 800 mg/kgBB dengan sonde sebanyak satu kali sehari selama 21 hari. P1, P2 dan P3 diberikan perlakuan preventif terlebih dahulu dengan diberikan ekstrak daun kelor (<i>Moringa oleifera</i>) dosis bertingkat yang sesuai dengan dosis tiap kelompok perlakuan 5 hari sebelumnya. Formalin digunakan sebagai zat penginduksi dengan dosis 100 mg/kgBB	milligram (mg)	Nominal

Tergantung	Gambaran mikroskopis ginjal tikus wistar.	Gambaran mikroskopis ginjal tikus wistar baru dapat dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada lima lapangan pandang.	-	Ordinal
------------	---	---	---	---------

Tabel 2. Kriteria Pembacaan Derajat Histopatologi Ginjal Skoring Semikuantitatif *Veniant et al.*¹⁹

Degenerasi	Skor	Nekrosis	Skor
< 25%	1	< 25%	1
25-<50%	2	25-<50%	2
50-<75%	3	50-<75%	3
75-100%	4	75-100%	4

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan Penelitian

- 1) Pembuatan ekstrak
 1. Daun kelor (*Moringa oleifera*).
 2. Etanol 70 %.
 3. Larutan aquades.
- 2) Perawatan dan perlakuan hewan coba
 1. 25 ekor tikus wistar jantan.
 2. Pakan dan minum standar secara *ad libitum*.

3. Formalin 100 mg/kgBB.
 4. Ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*).
- 3) Pembuatan preparat histologi
1. Larutan buffer formalin 10%.
 2. Hematoksilin Eosin.
 3. Larutan xylol.
 4. Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%.
 5. Larutan aquades.

3.7.2 Alat Penelitian

- 1) Pembuatan ekstrak
 1. Erlenmeyer.
 2. Pisau.
 3. *Waterbath*.
 4. Gelas ukur.
- 2) Perawatan dan perlakuan hewan coba
 1. Kandang hewan coba.
 2. Timbangan hewan coba.
 3. Sonde lambung *syringe*.
 4. Tabung penampung.
- 3) Alat pembuatan preparat histologi
 1. *Deckglass*.
 2. *Objekglass*.
 3. Mikrotom.

4. Oven.
5. Cetakan paraffin.
6. Mikroskop cahaya.
7. Alat bedah minor (untuk mengambil organ ginjal tikus).
8. Kamera.

3.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer hasil pengamatan gambaran mikroskopis ginjal tikus wistar dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3.7.4 Cara Kerja

3.7.4.1 Cara Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

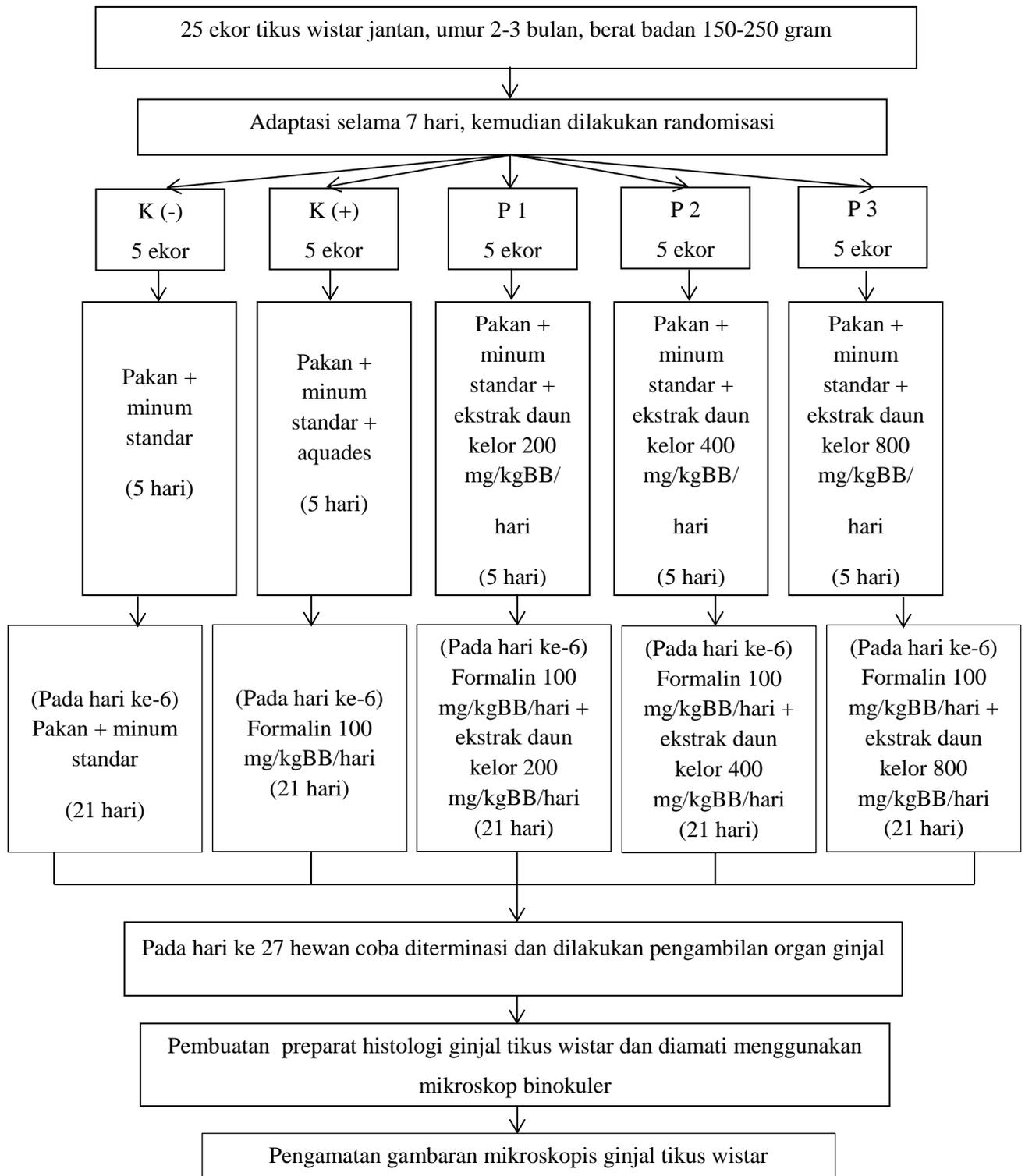
Daun kelor (*Moringa oleifera*) dibersihkan dan dipotong-potong lalu dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 80⁰C selama 2 hari. Daun yang sudah kering ditimbang lalu diletakkan dalam tabung erlenmeyer yang telah terisi etanol 70% kemudian dilakukan maserasi selama 24 jam dengan pengulangan 2-3 kali, lalu menyaring campuran tersebut dengan kain lunak untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh kemudian dilakukan penguapan dengan *waterbath* pada suhu 60-70⁰C. Setelah itu akan didapatkan ekstrak dalam bentuk gel. Hasil ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) ditimbang dan dikemas.

3.7.4.2 Perlakuan pada Hewan Coba

- 1) 25 ekor tikus wistar yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang tunggal dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*.
- 2) Pada hari ke-8, tikus wistar dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus wistar yang dipilih berdasarkan *simple random sampling*.
- 3) Menimbang berat badan masing-masing tikus wistar.
- 4) Mulai hari ke-8 pada kelompok pertama yaitu kelompok kontrol negatif, diberikan pakan standar dan aquadest tanpa perlakuan apapun.
- 5) Pada kelompok kedua yaitu kelompok kontrol positif, tikus wistar diberikan pakan standar dan aquadest selama 5 hari dan dilanjutkan pemberian formalin peroral 100 mg/kgBB/hari selama 21 hari.
- 6) Kelompok Perlakuan 1, diberikan pakan standar dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 200 mg/kgBB/hari selama 5 hari dan dilanjutkan pemberian formalin peroral 100 mg/kgBB/hari dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 200 mg/kgBB/hari selama 21 hari.
- 7) Kelompok Perlakuan 2, diberikan pakan standar dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 400 mg/kgBB/hari selama 5 hari dan dilanjutkan pemberian formalin peroral 100 mg/kgBB/hari dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 400 mg/kgBB/hari selama 21 hari.

- 8) Kelompok Perlakuan 3, diberikan pakan standar dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 800 mg/kgBB/hari selama 5 hari dan dilanjutkan pemberian formalin peroral 100 mg/kgBB/hari dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 800 mg/kgBB/hari selama 21 hari.
- 9) Tikus wistar di lakukan anestesi terlebih dahulu lalu dilakukan terminasi.
- 10) Mengambil organ ginjal, sampel ginjal tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet buffer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian ginjal dan 9 bagian buffer formalin 10%.
- 11) Tabung berisi sampel ginjal tikus wistar diletakkan ke rak tabung kemudian diserahkan ke analis guna mengolahnya mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE). Dari setiap sampel ginjal dibuat preparat dan akan dibaca dalam lima lapangan pandang yaitu dari keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan pembesaran 400x. Sasaran yang dibaca adalah perubahan gambaran histopatologis ginjal pada tikus wistar yaitu degenerasi dan nekrosis.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 1. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Jenis rancangan hipotesis yang digunakan pada penelitian ini adalah hipotesis komparatif numerik dengan lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan. Data yang diperoleh akan diolah dengan program komputer SPSS 21.0 dan dilihat distribusi datanya normal atau tidak dengan uji *Shapiro-Wilk*. Bila distribusi datanya normal, varians datanya sama, diuji beda dengan menggunakan statistik parametrik *One Way Anova*, Jika $p \leq 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Bila distribusi datanya tidak normal, atau varians data tidak sama, maka ditransformasi. Jika setelah ditransformasi tetap didapatkan distribusi data yang tidak normal atau tidak sama, maka dilakukan uji beda menggunakan statistik non parametrik *Kruskal-Wallis*, jika didapat $p \leq 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* (*Mann Whitney test*).

- 1) Jika $p \leq 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna
- 2) Jika $p > 0,05$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna

Jika didapatkan hasil yang berbeda bermakna, maka terdapat perbedaan yang bermakna gambaran mikroskopis ginjal tikus wistar pada pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan kelompok perlakuan lainnya. Jika didapatkan hasil yang tidak berbeda bermakna, maka tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan.

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro telah diajukan sebelum penelitian dilakukan. Tikus wistar dipelihara di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Hewan diberi makan dan minuman *ad libitum*. Untuk perlakuan, hewan coba diberikan pakan kemudian formalin dicampur dengan aquades lalu disondekan pada pagi hari setelah itu diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis bertingkat menggunakan sonde pada sore harinya. Hewan diterminasi dengan cara pembedahan dengan sebelumnya dilakukan anestesi terlebih dahulu. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan. Seluruh biaya yang dikeluarkan untuk penelitian ini akan ditanggung oleh peneliti.

