

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *post test only-control group*.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2015 hingga Maret 2017, bertempat di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Farmakologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Islam Indonesia, serta Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada.

3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian yaitu bahan biologi tersimpan berupa blok parafin ginjal kanan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan yang telah mendapat perlakuan sebelum berumur 2-3 bulan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dengan sampel dari penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) dengan judul Perbedaan Kadar MDA (*Malondialdehyde*) dan Gambaran Histologis Testis pada Tikus Model Diabetes Tipe 2 yang Mendapat Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Penelitian tersebut menggunakan tikus *Rattus norvegicus* galur *Sprague Dawley* sebagai subjek penelitian.

3.3.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang akan digunakan berjumlah 20 blok parafin ginjal kanan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*. Penelitian ini tidak melakukan pengacakan dan penentuan kriteria inklusi maupun eksklusi. Pengacakan serta penentuan kriteria inklusi dan eksklusi dilakukan pada penelitian sebelumnya yaitu penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015).

Sampel penelitian berjumlah 20 terbagi menjadi 4 kelompok. Tiap kelompok terdapat 5 sampel. Pengelompokan sampel tersebut sesuai dengan perlakuan yang diberikan pada penelitian sebelumnya sebagai berikut,

1. Hewan coba sehat yang mendapatkan perlakuan berupa aquades 1 mL secara oral (K1),
2. Hewan coba DM tipe 2 yang mendapatkan perlakuan berupa aquades 1 mL secara oral (K2),
3. Hewan coba DM tipe 2 yang mendapatkan ekstrak metanol daging buah mahkota dewa 250 mg/KgBB secara oral (P1),
4. Hewan coba DM tipe 2 yang mendapatkan vitamin E secara oral 100 mg/KgBB (P2).

Kondisi DM tipe 2 diinduksi dengan injeksi NAD (230 mg/KgBB) yang diikuti dengan injeksi STZ (65 mg/KgBB) secara intraperitoneal dengan selisih waktu injeksi NAD dan STZ selama 15 menit, sedangkan hewan coba sehat diberikan injeksi pelarut NAD dan STZ secara intraperitoneal sebagai plasebo. Perlakuan diberikan setelah gula darah hewan coba terkonfirmasi sesuai kelompok perlakuan hewan coba selama 6 minggu. Dasar pengambilan jumlah sampel tiap kelompok berdasarkan jumlah minimal dengan cadangan 1 sampel tiap kelompok yang dihitung dengan rumus *Resource Equation* (Charan *et al.*, 2013) sebagai berikut,

$$E = (\text{Jumlah total hewan coba} - \text{Jumlah total kelompok})$$

Keterangan: E: *Degree of Freedom* (DF)

Angka E dianggap optimal jika dalam rentang 10 hingga 20 (Charan *et al.*, 2013).

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian vitamin E dosis 100 mg/kgBB dan ekstrak metanol daging buah mahkota dewa dosis dengan dosis 250 mg/kgBB.

3.4.2. Variabel Tergantung

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah sel tubulus ginjal nekrosis tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*.

3.5. Definisi Operasional

3.5.1. Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa

Ekstrak metanol daging buah mahkota dewa dengan dosis 250 mg/kg (Triastuti *et al.*, 2009). Ekstrak metanol daging buah mahkota dewa adalah hasil ekstraksi daging buah mahkota dewa dengan metanol, diberikan pada kelompok perlakuan mahkota dewa dengan dosis 250 mg/kg berat badan, satu kali sehari per sonde selama 6 minggu. Buah mahkota dewa yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Merapi Herbal Farma dari pohon yang tumbuh di daerah Kaliurang, Sleman, Yogyakarta. Sebagian tanaman mahkota dewa yang dipergunakan pada penelitian ini dideterminasi di Laboratorium Farmakologi Fakultas MIPA UII. Surat determinasi buah mahkota dewa terlampir pada Lampiran 5. Pembuatan ekstrak ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas MIPA. Langkah-langkah metode pembuatan ekstrak metanol daging buah mahkota dewa terlampir pada Lampiran 6.

3.5.2. Vitamin E

Vitamin E adalah serbuk farmagrid vitamin E yang didapatkan dari perusahaan farmasi Dexa Medika, diberikan pada kelompok perlakuan vitamin E dengan dosis 100 mg/kg berat badan, satu kali sehari per sonde selama 6 minggu (Momeni dan Eskandari, 2012).

3.5.3. Jumlah Sel Tubulus Ginjal Nekrosis

Jumlah sel tubulus ginjal nekrosis adalah jumlah sel teramati yang mengalami nekrosis (piknosis dan karioreksis) dan masih memiliki gambaran batas inti sel yang jelas pada tubulus konvolutus proksimal dan distal berpenampang bulat pada korteks ginjal kanan. Gambaran piknosis dan karioreksis terdapat pada Gambar 3. Jumlah tubulus yang diamati sebanyak 100 tubulus yang diambil secara acak dan merata dari 5 lapang pandang berbeda (Zhang *et al.*, 2008). Skema tata cara pengambilan lapang pandang dilampirkan pada Lampiran 2. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX21 yang dilengkapi Optilab ginjal kanan masing-masing kelompok hewan coba.

3.5.4. Berat Badan Tikus

Berat badan tikus adalah massa hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) pada akhir perlakuan sebelum terminasi yang diukur dengan neraca massa dengan ketelitian 0,01 gram.

3.5.5. Berat Ginjal

Berat ginjal adalah massa ginjal kanan hewan coba (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) yang diukur setelah tahap terminasi dengan menggunakan neraca massa dengan ketelitian 0,001 mg.

3.5.6. Volume Ginjal

Volume ginjal adalah volume organ ginjal kanan hewan coba (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) yang diukur setelah tahap terminasi dengan menggunakan gelas ukur dengan ketelitian 0,5 mL. Pengukuran dilakukan dengan mengamati selisih perubahan aquades pada gelas ukur sebelum dan sesudah ginjal kanan dimasukkan (Larkin *et al.*, 2012).

3.5.7. Indeks Relatif Organ

Indeks relatif organ adalah persentasi berat ginjal dibanding berat badan tikus dalam persen. Perhitungan dilakukan dengan cara menghitung berat ginjal dibagi berat badan tikus dikali seratus (Aniagu *et al.*, 2005).

3.6. Instrumen Penelitian (Alat dan Bahan)

3.6.1. Alat Penelitian

1. Alat-alat gelas
2. Set alat bedah
3. Tempat penampung hewan coba dan organ yang diawetkan
4. Seperangkat alat untuk preparasi dan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)
5. Mikroskop cahaya Olympus CX21 dengan Optilab

3.6.2. Bahan Penelitian

1. Ginjal kanan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* yang telah mendapat perlakuan sebanyak 20 buah.
2. Aquadestilata

3. Bahan-bahan untuk prosesing jaringan dengan metode parafin
4. Bahan-bahan untuk pewarnaan HE

3.7. Alur Penelitian

3.7.1. Terminasi

Pada akhir perlakuan dari penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015), seluruh hewan coba dikorbankan dengan cara dekapitasi dibawah anestesi ringan menggunakan eter, kemudian dilakukan pengambilan ginjal kanan. Ginjal kemudian diukur berat dan volumenya sebelum disimpan dalam tabung berisi larutan PBS formalin untuk persiapan pembuatan preparat mikroskopis.

3.7.6. Pembuatan Preparat Mikroskopis

Organ ginjal yang telah difiksasi kemudian diambil untuk dibuat preparat mikroskopis metode parafin dan pewarnaan HE di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Gajah Mada. Langkah-langkah pembuatan preparat mikroskopis secara terinci dilampirkan pada bagian Lampiran 1.

3.7.7. Pengamatan Preparat Mikroskopis

Dari sediaan yang diperiksa, ditentukan lapang pandang yang akan diamati dengan pola yang sama menggunakan perbesaran 40X untuk menentukan 5 lapang pandang terpilih dan selanjutnya perbesaran 100X untuk menentukan 2 lapang pandang terpilih. Skema tata cara penentuan lapang pandang yang akan diamati dilampirkan pada Lampiran 2. Total 10 lapang pandang terpilih akan diamati gambaran nekrosis sel tubulus ginjal yang ditemukan sebanyak 10 tubulus untuk masing-masing lapang pandang terpilih. Pengamatan ciri gambaran nekrosis sel tubulus ginjal dilakukan dengan menggunakan perbesaran 400X. Gambaran nekrosis (piknosis dan karioreksis) sel tubulus terdapat pada Gambar 3. Semua pengamatan preparat histologi dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dilengkapi dengan optilab dan dilakukan dokumentasi data penelitian. Pengamatan dilakukan secara *single blind* oleh peneliti dibantu 1 orang interobserver. Validitas pengamatan dilakukan dengan melakukan uji t berpasangan terhadap hasil pemeriksaan. Hasil pengamatan dianggap valid jika nilai $p > 0,05$.

3.8. Analisis Data

Analisis dilakukan dengan bantuan perangkat lunak SPSS versi 15.00 untuk OS. Microsoft Windows XP. Karakteristik hewan coba ditampilkan dalam tabel yang mencantumkan rerata dan standar deviasi. Uji normalitas dilakukan dengan Uji *Saphiro Wilk*. Hasil data yang menunjukkan terdistribusi secara normal dilanjutkan dengan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) 1 jalan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok subjek penelitian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey HSD*. Semua uji dilakukan dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

3.9. Etika Penelitian

Pada penelitian akan selalu diusahakan untuk dilakukan langkah-langkah etika penelitian yaitu,

1. Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan jujur baik dari pengambilan data, pengambilan pustaka, perlakuan hewan coba, analisis data, maupun kegagalan, dan keberhasilan penelitian,
2. Peneliti telah mengajukan kaji etik kepada Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia sebelum melaksanakan prosedur penelitian di laboratorium dan telah mendapatkan persetujuan dengan nomor registrasi 38/Ka.Kom.Et/70/KE/VI/2016. Surat keterangan lolos kaji etik terlampir pada Lampiran 4.
3. Peneliti menggunakan ginjal kanan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang didapat dari penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2015) dengan judul Perbedaan Kadar MDA (*Malondialdehyde*) dan Gambaran Histologis Testis pada Tikus Model Diabetes Tipe 2 yang Mendapat Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia yang telah disetujui Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan nomor registrasi 21/Ka.Kom.Et/70/KE/VI/2015. Surat *ethical clearance* tersebut dilampirkan pada Lampiran 3.

4. Peneliti telah mengajukan permohonan izin terlebih dahulu sebelum melaksanakan penelitian. Permohonan izin ditujukan untuk laboratorium farmakologi sebagai tempat nekropsi dan laboratorium histologi sebagai tempat pengamatan data Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.



