

BAB III

SUBJEK/OBJEK/BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek dan Populasi Penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus Wistar betina umur 3-4 minggu sebanyak 28 ekor berasal dari Biofarma.

- Kriteria inklusi sebagai berikut:

1. Tikus sehat (tidak tampak rambut kusam, rontok, gundul, dan tikus bergerak aktif dan lincah)
2. Berat badan 20-60g
3. Tikus belum pernah di gunakan dalam penelitian sebelumnya

- Kriteria eksklusi:

1. Mengalami penurunan berat badan pada masa adaptasi.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang di gunakan adalah sebagai berikut:

1. Daun sirsak (berasal dari Herbarium Unpad)
2. 7,12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA) (berasal dari Sigma- Aldrich. St Louis)
3. Minyak jagung
4. Pakan Standar Tikus
5. Air
6. Formalin 10%
7. Bahan pembuatan preparat

8. Bahan pewarnaan preparat

- hematoxylin
- eosin

3.1.3 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Kandang
2. Sonde
3. Mikroskop cahaya
4. Timbangan
5. Peralatan pembuatan ekstrak
 - Alat pengiris
 - Alat gerinding
 - Maserator
 - Kertas saring
 - *Rotary evaporator*
6. Alat-alat untuk pembuatan preparat
 - *Tissue processor*
 - Mikrotom
 - *Object glass*
 - *Hot plate*
 - *Cover glass*

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni *in vivo*. Metode yang di gunakan adalah uji pemberian ekstrak daun sirsak terhadap tikus Wistar betina yang diinduksi DMBA. Selanjutnya akan diobservasi gambaran mikrostruktur dari tikus yang telah diterapi oleh ekstrak daun sirsak.

3.2.2 Penentuan Kadar Ekstrak Air Daun Sirsak

Kadar ekstrak air daun sirsak yang di gunakan pada penelitian ini sesuai dengan penelitian terdahulu. Pada penelitian terdahulu konservasi efektif yang menurunkan proliferasi sel kanker adalah sebesar 200 mg/kgbb. Selanjutnya pada penelitian ini digunakan : konsentrasi 1 adalah $\frac{1}{2} \times 200\text{mg/kgbb} = 100\text{mg/kgbb}$, konsentrasi 2 adalah 200mg/kgbb, konsentrasi 3 adalah $2 \times 200\text{mg/kgbb} = 400\text{mg/kgbb}$.⁴⁰

3.2.3 Definisi Konsep dan Operasional Variable

3.2.3.1 Definisi Konsep Variabel

- a. Variabel bebas:
 - i. Konsentrasi zat ekstrak daun sirsak

- b. Variabel terikat:
 - i. Ukuran *capsula Bowman*
 - ii. Jumlah sel *hydropic tubulus*

- c. Variabel terkendali:
 - i. Makanan tikus

- ii. Lingkungan pemeliharaan tikus
- iii. Konsentrasi DMBA
- iv. Jenis tikus
- v. Usia dan berat badan tikus

3.2.3.2 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel Bebas dan Terikat

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
Konsentrasi ekstrak daun sirsak	Konsentrasi ekstrak daun sirsak berdasarkan penelitian terdahulu yaitu 200mg/kg (n), (1/2n), dan (2n)	Timbangan	Kategorik	Konsentrasi 1 : 100 mg/kg/bb Konsentrasi 2 : 200 mg/kg/bb Konsentrasi 3: 400 mg/kg/bb
Dilatasi dari capsula bowman	Jarak terjauh antara visceral dan parietal layer dihitung rerata dari tiga area preparat	<i>Image raster</i>	Numerik	Rerata jarak terjauh (μm)
Sel <i>hydropic</i> pada epitel tubulus ginjal	Sel <i>hydropic</i> merupakan sel yang mengalami perubahan akumulasi cairan di dalam sel. Jumlah sel <i>hydropic</i> dihitung rerata dari tiga area preparat	<i>Image raster</i>	Numerik	Rerata jumlah sel <i>hydropic</i>

3.2.4 Jumlah Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Penentuan jumlah sampel tiap kelompok berdasarkan pada formulasi Federer.⁴¹ Banyaknya perlakuan (t) adalah lima, sehingga jumlah sampel tiap kelompok (r) adalah:

$$(r-1)(t-1) \geq 15$$

$$(r-1)(5-1) \geq 15$$

$$(r-1) 4 \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 5$$

t = treatment, r = repeatation

Jumlah minimal sampel yang sudah dilaksanakan pada penelitian ini adalah 5 ekor tikus untuk setiap kelompok perlakuan. Total sample adalah 5 kelompok x 5 = 25 ekor ditambah 10% untukantisipasi dropout sehingga total tikus menjadi 28. Seiring berjalannya penelitian, tikus yang sampai pada proses nekropsi menjadi 17 ekor disebabkan karena tikus mati sebelum waktunya. Hal tersebut dapat terjadi karena adanya faktor lain seperti lingkungan yang tidak cocok yang menimbulkan stress pada tikus.

3.2.5 Kelompok Perlakuan

Tikus dibagi menjadi 5 kelompok, masing masing kelompok 5 sampel yaitu:

- a Kelompok I (kontrol normal) tikus Wistar betina yang di beri pakan normal tanpa diinduksi DMBA
- b Kelompok II (Kontrol negatif) tikus Wistar betina yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal
- c Kelompok III (Perlakuan 1) tikus Wistar betina yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal + ekstrak daun sirsak konsentrasi 100mg/kg BB
- d Kelompok IV (Perlakuan 2) tikus Wistar betina yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal + ekstrak daun sirsak konsentrasi 200mg/kg BB
- e Kelompok V (Perlakuan 3) tikus Wistar betina yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal + ekstrak daun sirsak konsentrasi 400mg/kg BB

3.2.6 Prosedur Penelitian

3.2.6.1 Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak

Daun sirsak yang digunakan adalah dari STIH ITB. Kemudian bahan uji ini diekstrak dengan pelarut air, pengekstrakan dilakukan di laboratorium pusat penelitian biosains dan bioteknologi Universitas Institut Teknologi Bandung, pembuatan ekstrak dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- 1) Sejumlah 10kg daun sirsak basah di potong-potong membentuk simplisia dan dicuci sampai bersih, kemudian dikeringkan. Setelah kering, simplisia ini dihaluskan dengan alat grinding sehingga menghasilkan 1 kg simplisia kering.
- 2) Daun sirsak yang telah menjadi bubuk dimasukkan ke dalam maserator yang alasnya telah diberi kapas, lalu tambahkan pelarut air (H₂O) dan diamkan selama 24 jam.
- 3) Keluarkan larutan dari outlet dibawah maserator.
- 4) Saring ekstrak dengan kertas saring. Larutan ini disebut ekstrak encer.
- 5) Tambahkan air baru ke dalam ampas yang tersisa di dalam maserator.
- 6) Ulangi penambahan pelarut air sampai larutan yang keluar dari outlet maserator tidak berwarna lagi (5-6 kali).
- 7) Pekatkan ekstrak encer yang didapat dari maserator dengan rotary evaporator sampai tidak ada lagi pelarut yang menetes di kondensor rotary evaporator.
- 8) Ekstrak yang didapat adalah ekstrak pekat berbentuk serbuk.

3.2.6.2 Penginduksian DMBA

Tikus Wistar betina usia 3-4 minggu yang telah di adaptasi selama 1 minggu akan di induksi DMBA dengan konsentrasi 20mg/kg BB selama 4 minggu dengan pemberian 2 kali setiap minggunya.⁴²

3.2.6.3 Perlakuan Percobaan

Perlakuan pemberian ekstrak air daun sirsak di mulai setelah 4 minggu induksi DMBA , dan pemberian ekstrak air daun sirsak selama 3 minggu.

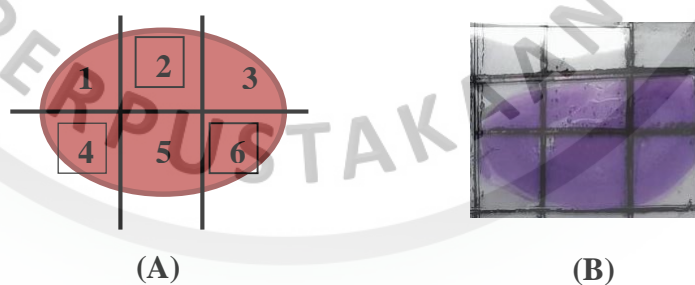
3.2.6.4 Pembuatan Sediaan Histologi

Pada minggu ke-8 setelah perlakuan tikus dikorbankan terlebih dahulu dianestesi dengan menggunakan ketamin. Jaringan ginjal di eksisi lalu di fixasi menggunakan 10% *Phosphat Buffer Saline* (PBS)-formalin selama 24 jam lalu di ganti oleh 70% alcohol dan dilanjutkan proses proses pembuatan preparat dengan cara merendam jaringan dengan larutan *buffered neutral formalin* (BNF) yang berfungsi sebagai bahan pengawet agar struktur jaringan tidak rusak, lalu diberi larutan dekalsifikasi berfungsi untuk menghilangkan garam-garam kalsium agar pemotongan tulang menjadi lunak, setelah itu dilakukan pemotongan jaringan organ menggunakan pisau scalpel dengan ketebalan 0,3 – 0,5 mm dan disusun kedalam tissue cassette, lalu dilakukan proses dehidari dan vakum yang berfungsi untuk menghilangkan udara dari dalam jaringan, lalu mencetak blok parafin dan memotong blok jaringan, Dilanjutkan dengan pewarnaan hematoxylin-eosin yang terdiri dari beberapa tahapan; (1) Deparafinisasi menggunakan xylol, (2) Rehidrasi menggunakan alkohol absolut, alkohol 90% dan alkohol 80%, (3) Pewarnaan I

menggunakan pewarna hematoxylin untuk memberi warna pada inti dan sitoplasma pada jaringan, (4) Differensiasi menggunakan larutan HCl 0,6%, (5) Pewarnaan II menggunakan eosin untuk memberikan warna merah pada sitoplasma sel, (6) Dehidrasi menggunakan alkohol 80%, alkohol 90% dan alkohol absolut, (7) Mounting menggunakan entelan/canada balsem untuk mengawetkan jaringan yang telah diwarnai.

3.2.6.5 Pengamatan Sediaan

Pengamatan sediaan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dan *image raster*. Peneliti mengambil bagian preparat yang berada pada sudut kanan atas agar sesuai dengan yang diharapkan, karena tidak semua preparat memiliki 4 sisi ginjal. Sebelum dilihat menggunakan mikroskop, preparat yang akan diamati ditempelkan plastik mika yang sudah dibagi menjadi 6 area (gambar 3.1. A & B). Setiap area meliputi satu sisi ginjal. Dari area yang diambil, diasumsikan memiliki nomor 1-6. Pengambilan data dilakukan pada area nomor 2, 4 dan 6 untuk mewakili seluruh nomor.

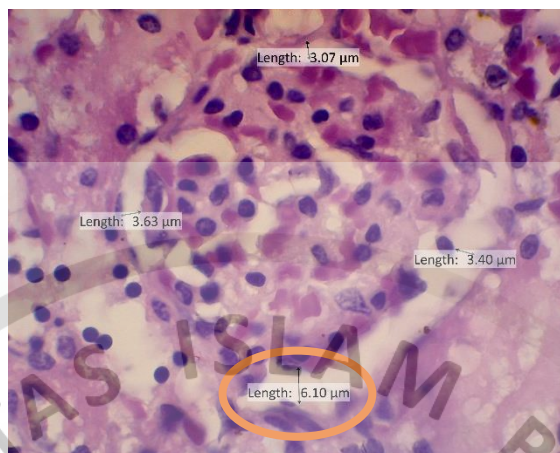


Gambar 3.1 Cara Pengambilan Data

- (A) Ilustrasi preparat ginjal yang telah dibagi menjadi 6 area
 (B) Gambar preparat ginjal yang telah dibagi menjadi 6 area

Pengamatan sediaan meliputi pengamatan ukuran *capsula Bowman* pada bagian korteks dan jumlah sel *hydropic* pada tubulus ginjal di medula. Pengamatan pada *capsula Bowman* dilakukan dengan mengukur jarak antara *visceral* dan

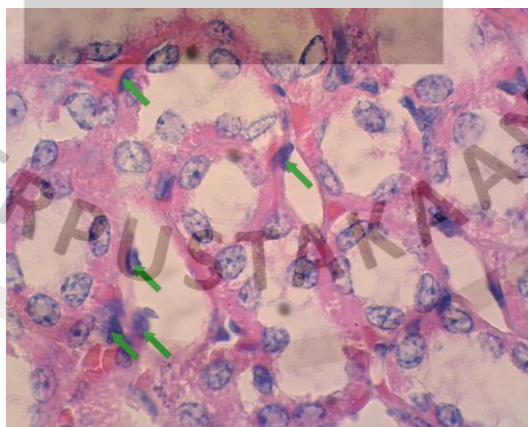
parietal *layer*. Jarak yang diukur diambil dari empat sisi yaitu sisi atas, bawah, kanan dan kiri lalu diambil jarak terjauhnya (gambar 3.2).



Gambar 3.2 Pengamatan *Capsula Bowman*

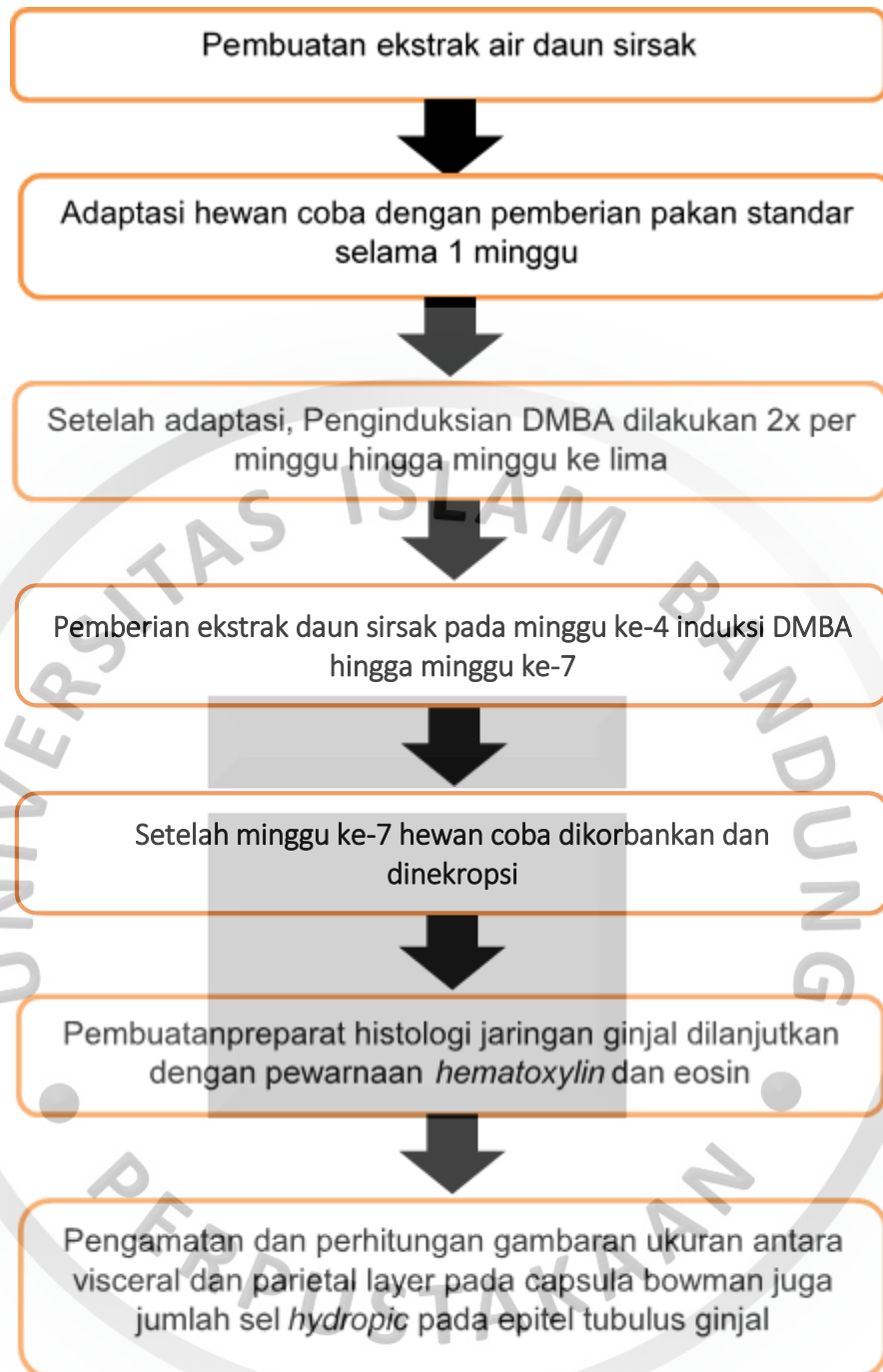
Pengamatan dengan mengukur jarak antara visceral dan parietal layer dari *capsula Bowman*. Jarak terjauh yang digunakan untuk pengambilan data.

Pengamatan sel *hydropic* dilakukan dengan menghitung sel *hydropic* pada setiap kelompok perlakuan sesuai dengan area. Penghitungan sel *hydropic* dilakukan dengan bantuan *image raster*. Penggunaan *image raster* akan memudahkan penghitungan, dengan penandaan sel *hydropic*nya (Gambar 3.3).



Gambar 3.3 Pengamatan Sel *Hydropic*

Panah berwarna hijau menunjukkan satu sel *hydropic*.



Gambar 3.4 Bagan Alur Penelitian

3.2.7 Analisis Data

Analisis hasil penelitian dilakukan dengan observasi perbedaan mikrostruktur ginjal tikus pada setiap perlakuan. Variabel bebas merupakan data

kategorik dan variabel terikat merupakan data numerik berupa nilai rerata yang akan diolah dengan uji normalitas dan uji beda *Analysis of variance* (Anova).

3.2.8 Etik Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan tikus Wistar betina berusia 3-4 minggu yang sebelumnya telah dikembangkan oleh Biofarma. Penggunaan tikus Wistar ini dilakukan dengan memperhatikan prinsip 3R yaitu:

- *Replacement*, penelitian dilakukan dengan menggunakan hewan coba golongan yang paling rendah yang sesuai untuk jenis penelitian ini yaitu tikus.
- *Reduce*, digunakan penghitungan jumlah sampel untuk optimalisasi jumlah hewan yang akan digunakan sehingga tidak melebihi jumlah minimal yang di perbolehkan.
- *Refinement*, peneliti menggunakan metode yang tepat untuk uji kepada hewan coba sehingga kesejahteraan hewan coba dapat tetap terjaga.

Selain 3R peneliti juga memperhatikan aspek 5F (*5 freedoms*) yaitu :

- *Freedom from hungry and thirsty*, peneliti akan memberikan pakan secara adlibitum.
- *Freedom from discomfort*, untuk kenyamanan hewan uji, peneliti akan menempatkan tikus minimal 3 dan maksimal 5 dalam satu kandang
- *Freedom from pain, injury and disease*, pada saat sebelum dikorbankan hewan uji akan diberi anastesi, pemberian perlakuan dilakukan oleh teknisi yang kompeten dibidangnya, jika ada hewan uji yang sakit segera dipisahkan, menghindari kemungkinan saling melukai.

- *Freedom from fear and distress*, peneliti memastikan keadaan hewan uji dalam kondisi yang nyaman.
- *Freedom to expres natural behavior*, peneliti tidak memisahkan tikus sendiri agar bersosial, menjelang malam lampu dimatikan, jika siang hari mendapatkan cahaya yang cukup dan pemberian serbuk kayu sebagai alas kandang.

3.2.9 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung.

