

BAB III

SUBJEK /BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek, Bahan, dan Metode penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus galur Wistar betina usia 3-4 minggu, sebanyak 30 ekor berasal dari Biofarma yang dibagi 5 kelompok perlakuan.²

Kriteria inklusi , terdiri dari :

- tikus sehat (bergerak aktif dan lincah, rambut tidak tampak kusam dan rontok)
- Bergerak aktif
- Tikus belum pernah digunakan dalam penelitian sebelumnya

Kriteria eksklusi :

- Sakit atau mengalami penurunan berat badan selama masa adaptasi

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Daun dewa
2. 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) (berasal dari Sigma-Aldrich, St. Louis)
3. Minyak jagung
4. Pakan standar tikus BR-2

5. Aquades
6. PBS-Formalin 10%
7. Bahan pembuatan dan pewarnaan preparat
 - *Hematoxylin*
 - Eosin

3.1.3 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Kandang terbuat dari bak semi plastik dengan ukuran panjang x lebar x tinggi = 30 x 45 x 20 cm, dengan bagian atas tertutup oleh kawat strumun.
2. Sonde untuk memasukkan ekstrak daun dewa
3. Spuit untuk memasukkan DMBA melalui intraperitoneal
4. Mikroskop cahaya
5. Timbangan analitik
6. Peralatan untuk pembuatan preparat
 - Larutan fixatif jaringan : formalin 10%
 - *Tissue processor*
 - Mikrotom
 - *Object glass*
 - *Hot plate*
 - *Cover glass*

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Metode Penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium murni *in vivo*, dengan memberikan ekstrak air daun dewa terhadap tikus Wistar betina yang diinduksi DMBA. Selanjutnya dilakukan observasi setelah diinduksi dan diberi perlakuan selesai diberikan pada jangka waktu yang telah ditentukan. Observasi preparat dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dan image raster.

Fokus penelitian ini adalah untuk melihat apakah terdapat perbedaan gambaran mikrostruktur ginjal dari tikus yang telah diinduksi DMBA dan diberi ekstrak air daun dewa, DMBA dan hasil data disajikan secara deskripsi.

3.2.2 Penentuan Kadar Ekstrak Daun Dewa

Kadar ekstrak air daun dewa yang di gunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

Perlakuan I = 250 mg/kgBB tikus

Perlakuan II = 500 mg/kgBB tikus

Perlakuan III = 750 mg/kgBB tikus.²⁵

3.2.3 Definisi Konsep dan Operasional Variabel

Variabel pada penelitian ini adalah :

Mengukur Jarak antara Kapsula Bowman Parietalis dengan Viseralis dan Menghitung Jumlah Sel hidropik pada sel epitel tubulus ginjal dengan menggunakan *image raster*.

3.2.3.2 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Skala Ukur
Konsentrasi ekstrak air daun dewa	Kelompok 1 : kontrol positif Kelompok 2 : kontrol negatif (diinduksi DMBA) Kelompok 3 : 250mg/kgBB Kelompok 4 : 500mg/kgBB Kelompok 5 : 750mg/kgBB	Numerik
kapsula bowman	jarak terjauh antara visceral dan parietal layer dihitung rerata dari tiga area preparat dan diukur menggunakan <i>image raster</i>	Numerik
Jumlah sel hidropik pada epitel tubulus	Sel hidropik merupakan sel yang mengalami perubahan akumulasi cairan di dalam sel. Jumlah sel hidropik dihitung rerata dari tiga area preparat dan di dihitung menggunakan <i>image raster</i>	Numerik

3.2.4 Jumlah Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Penentuan jumlah sampel tiap kelompok didasarkan pada rumus Frederer dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Jumlahnya perlakuan (t) adalah lima, sehingga jumlah sampel perlakuan (r) adalah

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

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

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 5$$

Keterangan:

r: *repetition* yaitu jumlah sample pada tiap kelompok

t: *treatment* yaitu jumlah kelompok perlakuan

Jumlah minimal sample yang di gunakan untuk penelitian ini adalah 5 ekor tikus untuk setiap kelompok perlakuan. Total sample adalah 5 kelompok x 5 ekor = 25 ekor ditambah 10% untukantisipasi *dropout* sehingga total tikus menjadi 28 ekor.

3.2.5 Kelompok Perlakuan

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

- a. Kelompok I (Kontrol normal): Tikus galur Wistar betina yang diberi pakan normal.
- b. Kelompok II (Kontrol negatif): Tikus galur Wistar betina yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal.
- c. Kelompok III (Pelakuan 1): Tikus galur Wistar betina yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal + ekstrak air daun dewa 250 mg/kgBB.

- d. Kelompok IV (Perlakuan 2): Tikus galur Wistar betina yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal + ekstrak air daun dewa 500 mg/kgBB.
- e. Kelompok V (Perlakuan 3): Tikus galur Wistar betina yang diinduksi DMBA dan diberi pakan normal + ekstrak air daun dewa 750 mg/kgBB.

3.2.6 Prosedur Penelitian

3.2.6.1 Pembuatan Ekstrak Air Daun Dewa (*Gynura divaricata*)

Daun dewa yang digunakan adalah dari Laboratorium Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Hayati Institut Teknologi Bandung. 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:

Daun dewa yang sudah dipanen diambil 1kg lalu diekstraksi dengan 8L air setiap 1kg simplia kering, dalam suhu 100 derajat selama 1,5 jam di dalam kondensor reflux. Hasil ini disaring, 90% dari total gabungan filtratnya dipekatkan pada suhu 50 derajat *celcius* oleh evaporator, lalu diliofilisasi untuk memperoleh hasil 26,3gram ekstrak kering.¹⁹ Cara lain membuat ekstrak air daun dewa ditimbang dulu 3gram dalam 300 ml air, dengan suhu 121 derajat *celcius*, kemudian di ekstraksi 3 kali lalu di sentrifugasi buat memperoleh supernatant.²⁰

3.2.6.2 Perlakuan Percobaan

Perlakuan pemberian ekstrak daun dewa di mulai setelah 2 minggu induksi DMBA, dan pemberian ekstrak daun dewa dilakukan hingga minggu ke-15 dengan konsentrasi yang di berikan 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, dan 750 mg/kgBB dengan cara transesofageal menggunakan sonde oral^{17, 22}

3.2.6.3 Pembuatan Sediaan Histologi

Pada minggu ke-8 tikus dikorbankan dengan terlebih dahulu dianestesi menggunakan ketamine HCL dengan dosis 0,2 cc/100gBB secara intramuskular. Selanjutnya dilakukan pembedahan dan nekropsi pengambilan mikrostruktur jaringan ginjal. Jaringan ginjal di eksisi lalu di fixasi menggunakan 10% PBS-formalin selama 24 jam selanjutnya dilakukan proses pembuatan preparat histopatologi. Preparat yang telah diwarnai dengan pewarnaan *hematoxylin* dan *eosin* kemudian di observasi menggunakan mikroskop cahaya pada zona 2,4 dan 6 pada seluruh lapang pandang dengan pembesaran lensa objektif 100x.²³

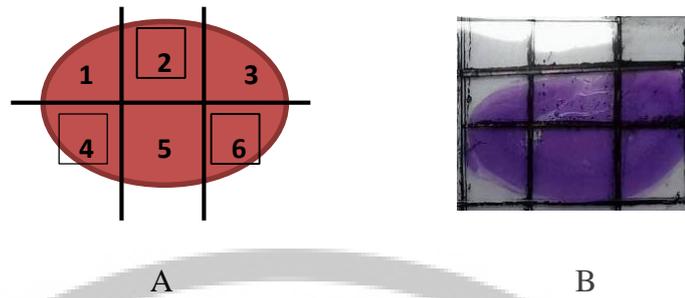
Pewarnaan *hematoxylin* dan *eosin* adalah pewarnaan standar yang digunakan untuk pemeriksian mikroskop berbagai jenis jaringan dan perubahan morfologi yang dapat membantu menegakkan diagnosis kanker. *Hematoxylin* berwarna biru-ungu tua dan mewarnai asam nukleat dengan reaksi kompleks dan belum diketahui. *Eosin* berwarna merah muda dan mewarnai protein secara tidak spesifik pada nukleus berwarna biru menunjukkan berbagai pola kondensasi heterokromatin (pewarnaan *hematoxylin*) yang bervariasi jenis sel dan tipe kanker yang secara diagnostik sangat

penting. Sedangkan sitoplasma dan matriks ekstraseluler berwarna merah muda yang bervariasi.^{24, 25}

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.

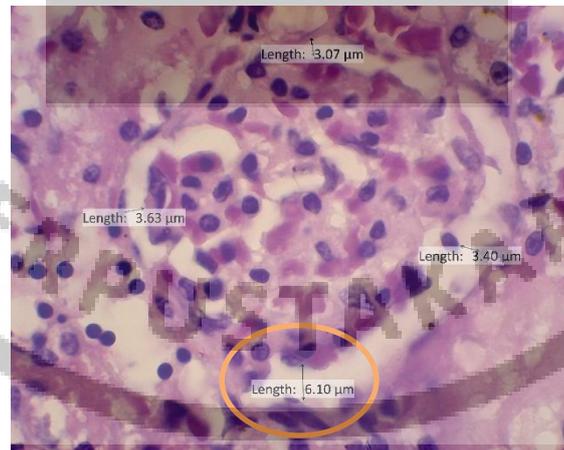
3.2.6.5 Pengamatan Sediaan

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. 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 hidropik pada tubulus ginjal. Pengamatan pada capsula bowman dilakukan dengan mengukur jarak antara visceral dan parietal layer. Jarak yang diukur diambil dari tiga sisi lalu diambil jarak terjauhnya (gambar 3.2).

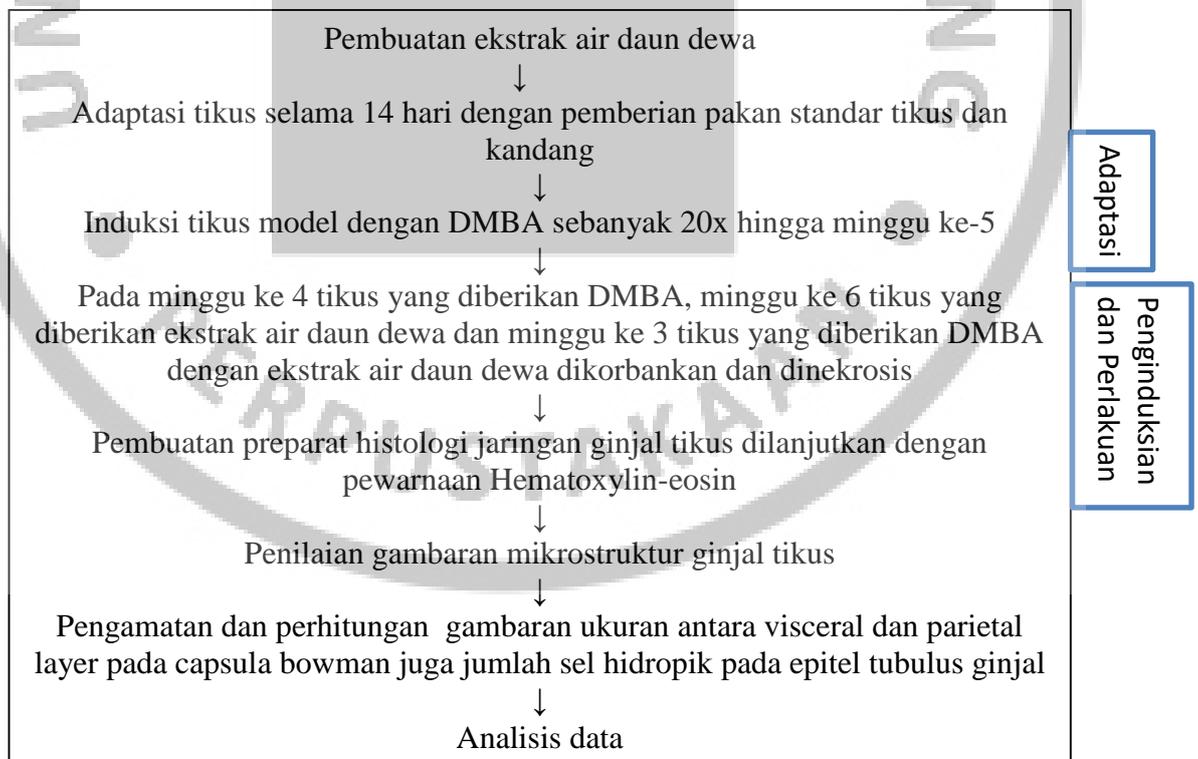


Gambar 3.2 Pengamatan capsula bowman. Pengamatan dengan mengukur jarak antara visceral dan parietal layer dari capsula bowman. Jarak terjauh yang digunakan untuk pengambilan data.

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



Gambar 3.3 Pengamatan sel hidropik. Panah berwarna hijau menunjukkan satu sel hidropik.



Gambar 3.4 Alur Penelitian

3.2.7 Aspek 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 3R yaitu:²⁶

- a. *Replacement*: Penelitian dilakukan dengan menggunakan hewan coba golongan yang paling rendah yang sesuai dengan penelitian. Pada penelitian ini menggunakan tikus.²⁶
- b. *Reduce*: Digunakan perhitungan jumlah sampel untuk optimalisasi hewan coba yang digunakan sehingga tidak melebihi jumlah minimal yang diperbolehkan.²⁶
- c. *Refinement* : Peneliti memperlakukan hewan coba secara manusiawi sehingga kesejahteraan dapat tetap terjaga.²⁶

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

- a. *Freedom from hungry and thirsty*: Memberikan pakan secara ad libitum.
- b. *Freedom from discomfort*: Menentukan kenyamanan hewan uji, di dalam satu kandang tidak boleh terlalu sedikit dan terlalu banyak minimal 3 dan maksimal 5, kandang selalu dibersihkan, dan kandang diletakkan diruangan dengan pencahayaan yang cukup.
- c. *Freedom from pain, injury, and disease*: Jika ada yang sakit dipisahkan, dan dihindari kemungkinan saling melukai. Pada saat sebelum dikorbankan hewan uji akan diberi anastesi, pemberian perlakuan yang dilakukan oleh teknisi yang kompeten dibidangnya.

- d. *Freedom from fear and distress*: Peneliti memastikan keadaan hewan uji dalam kondisi yang nyaman.
- e. *Freedom to express natural behavior*: Peneliti tidak mengisolasi tikus dalam keadaan sendirian karena makhluk sosial, jika siang hari mendapatkan cukup cahaya, menjelang malam hari lampu dimatikan, dan pemberian serbuk kayu sebagai alas kandang.

3.2.8 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Universitas Islam Bandung di mulai dari masa adaptasi, penginduksian, perlakuan tikus dan pembuatan ekstrak di Pusat Penelitian Biosains dan Bioteknologi Universitas Institut Teknologi Bandung.

3.2.9 Waktu Penelitian

No.	Waktu	Kegiatan
1.	Januari-Februari 2019	Pencarian jurnal Penyusunan proposal penelitian Sidang usulan penelitian
2.	Maret 2019	Mempersiapkan daun sirsak perkebunan Mempersiapkan DMBA

3.	April 2019	Mengekstrak daun sirsak di Laboratorium pusat penelitian biosains dan bioteknologi Institut Teknologi Bandung Induksi DMBA di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung
4.	Mei-Juli 2019	Pemberian perlakuan Nekropsi dan pembuatan preparat
5.	September-Desember 2019	Pengamatan hasil penelitian Analisis statistik hasil yang didapat dan pembuatan pembahasan Pengumpulan artikel
6.	Januari 2020	