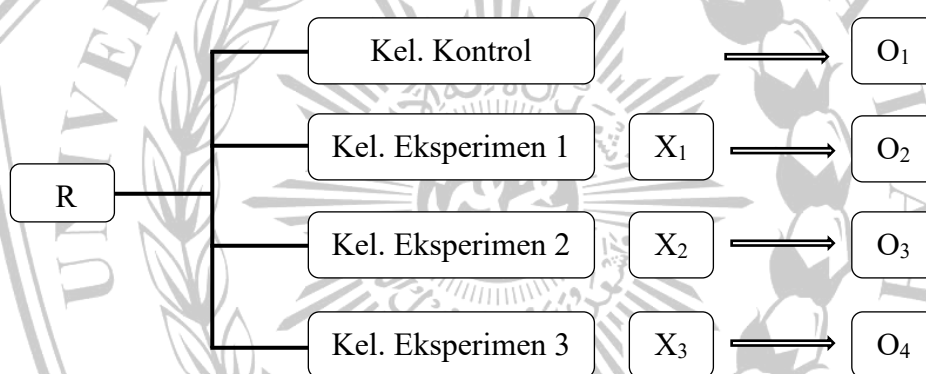


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Pendekatan dan Jenis Penelitian

Pendekatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kuantitatif dengan jenis penelitian *true eksperimen research* karena semua variabel luar yang berpengaruh pada jalannya percobaan berada dalam kendali peneliti. Desain yang digunakan *post test only control group design* dengan menggunakan satu kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan dan tiga kelompok eksperimen dengan perlakuan yang berbeda-beda. Sebagaimana ditunjuk melalui gambar 3.1



Keterangan :

R : Randomisasi Tikus (*Rattus novergicus*)

X : Perlakuan, yaitu pemberian jamu sari rapet rumah jamu X Kabupaten Sumenep dengan dosis yang berbeda di setiap perlakuan

O : Posttest pada kelompok kontrol dan eksperimen

Gambar 3. 1 Rancangan *post test only control group design*

Sumber : (Dokumen Peneliti, 2023)

3.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang kampus 2 yang beralamat di Jalan Bendungan Sutami No. 188, Sumbersari – Kota Malang. Laboratorium ini

merupakan tempat untuk menyimpan dan memberikan perlakuan terhadap tikus. Pengecekan hasil histologi dilakukan di Laboratorium Klinik Satwa Sehat Indonesia yang beralamat di Jalan Dako No. 52, Tidar – Malang. Waktu pelaksanaan ini dilakukan pada bulan Oktober-November 2022.

3.3. Populasi, Sampel dan Teknik Sampling

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini berupa hewan coba tikus putih betina (*Rattus novergicus*).

3.3.2 Sampel

Sampel penelitian ini terdiri dari tikus (*Rattus novergicus*) betina yang memiliki karakteristik:

- a. Berat badan ± 200 gram
- b. Usia 2 – 3 bulan
- c. Sehat secara fisik, ditandai dengan mata jernih, rambut mengkilat dan tidak rontok, feses yang tidak lembek serta bergerak aktif.

3.3.3 Teknik Sampling

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus $t(n-1)$. Penelitian ini membutuhkan 4 kelompok :

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n = 5$$

Keterangan :

t : Jumlah kelompok

n : jumlah sampel setiap kelompok

Berdasarkan hasil perhitungan yang diperoleh maka pada setiap kelompok berjumlah 3 ekor tikus yang diberikan perlakuan berbeda-beda sesuai kriteria yang telah ditentukan.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah jamu sari rapet yang diberikan pada tikus (*Rattus novergicus*) dengan dosis 0,54 g/200gBB/hari; 1,08 g/200gBB/hari; 1,62 g/200gBB/hari.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah histologi ginjal dan hati pada tikus betina (*Rattus novergicus*) setelah perlakuan.

3.4.3 Variabel Kontrol

Penelitian ini memiliki variabel kontrol berupa jenis kelamin tikus betina; berat badan tikus ± 200 gram.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Agar penelitian tidak terjadi kesalahan, maka setiap variabel perlu di definisikan. Definisi operasional dalam penelitian ini yang perlu dijelaskan yakni:

1. Metode sonde adalah memasukkan larutan dengan menggunakan alat spuit yang sudah dimodifikasi. Metode sonde dimulai dengan menempelkan spuit pada langit-langit mulut bagian atas tikus dan dimasukkan sampai esofagus dan lambung secara perlahan, sehingga cairan dapat masuk ke dalam lambung. Jamu sari rapet diseduh menjadi larutan jamu dan menggunakan spuit berukuran 3 cc.

2. Dosis adalah takaran obat/zat yang dapat memberikan efek pada farmakologis termasuk ginjal dan hati. Dosis yang digunakan berasal dari perhitungan konversi dosis manusia ke tikus, kemudian dibuat dengan takaran jamu yang berbeda setiap perlakuan yaitu 0,54 gram; 1,08 gram; dan 1,62 gram.
3. Bahan yang akan diujikan yaitu jamu sari rapet dalam bentuk bubuk dan instan yang didapat dari rumah jamu X Kabupaten Sumenep, Madura yang memiliki cara penggunaannya masih secara turun-menurun serta belum melalui uji praklinik.
4. Metode pemeriksaan yang digunakan yaitu perhitungan degenerasi hidrofik, nekrosis pada ginjal dan hati tikus yang dilakukan pada 5 lapang pandang yang berbeda (5LP).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Persiapan Penelitian

Dalam melaksanakan penelitian memerlukan beberapa tahapan persiapan yang dibutuhkan dalam penelitian yaitu:

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini sebagaimana Tabel 3.1

Tabel 3. 1 Alat-alat yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Alat	Jumlah	Kegunaan
1	2	3	4
1.	Kandang plastik	4 buah	Berukuran 30 cm x 45 cm x 15 cm sebagai menempatkan hewan tikus
2.	Botol minum tikus	8 buah	Wadah minum tikus
3.	Rak tempat kandang	1 buah	Menata kandang tikus
4.	Neraca digital	1 buah	Menimbang tikus, bahan atau sampel
5.	Baskom	1 buah	Membantu penimbangan hewan
6.	Gelas ukur	1 buah	Mengukur aquades dalam pembuatan larutan
7.	Corong kaca	1 buah	Menuangkan larutan
8.	Spatula	1 buah	Mengambil bahan dan mengaduk larutan

1	2	3	4
9.	Tabung reaksi	1 buah	Wadah larutan
10.	Botol flakon	3 buah	Menyimpan hasil jamu
11.	Spuit	1 buah	Menyonde tikus
12.	Tabung pembius	1 buah	Membius tikus
13.	Disecting set	1 set	Membedah tikus
14.	Baki bedah	1 buah	Membedah tikus
15.	Kertas label	24 buah	Melebeli sampel
16.	Botol sampel	24 buah	Menyimpan sampel
17.	Mikrotom	1 buah	Menyayat jaringan ginjal dan hati
18.	Inkubator	1 buah	Membuat preparat
19.	Kaca preparat	24 buah	Membuat preparat ginjal dan hati
20.	Kaca penutup	24 buah	Membuat preparat ginjal dan hati
21.	Mikroskop cahaya (<i>Nikon Eclipse tipe Ei</i>)	1 buah	Mengamati histologi
22.	<i>Optilab Microscope Camera</i>	1 buah	Dokumentasi hasil pengamatan
23.	Komputer	1 buah	Dokumentasi hasil pengamatan

Sumber : (Dokumen Peneliti, 2023)

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini sebagaimana tabel 3.2

Tabel 3. 2 Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Bahan	Jumlah
1.	Tikus (<i>Rattus novergicus</i>) betina	12 buah
2.	Makanan / pellet tikus	7 kg
3.	Sekam	6 kg
4.	Aquades	18 L
5.	Air hangat	1,8 L
6.	Jamu Sari Rapet bubuk	280 g
7.	Chloroform	200 ml
8.	Paraffin	1 kg
9.	HE (<i>Hematoxylin eosin</i>)	100 ml
10.	Larutan FAA	100 ml
11.	Alkohol 50%, 70%, 80%, 100%	1 L
12.	Xilol	1 L
13.	Entellen	100 ml
14.	Formalin 10%	720 ml

Sumber : (Dokumen Peneliti, 2023)

3.6.2 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini memiliki 3 perlakuan uji dan 1 perlakuan kontrol masing-masing 3 kali pengulangan. Pembagian kelompok pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

P0	→	K1, K2, K3
P1	→	P1 1, P1 2, P1 3
P2	→	P2 1, P2 2, P3 3
P3	→	P3 1, P3 2, P3 3

Keterangan :

K : air minum + pakan

P1 : Perlakuan jamu sari rapet 0,54 g/200gBB tikus/ hari

P2 : Perlakuan jamu sari rapet 1,08 g/200gBB tikus/ hari

P3 : Perlakuan jamu sari rapet 1,62 g/200gBB tikus/ hari

3.6.3 Pelaksanaan dan Alur Penelitian**1. Penyusunan Proposal *Ethical Clearence***

Penelitian ini telah memperoleh persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang dengan nomor E.5.a/197/KEPK-UMM/XI/2022.

2. Adaptasi dan Pemeliharaan Hewan Coba

Demi mencegah tikus betina mengalami stress yang memiliki dampak pada penelitian, maka tikus dilakukan adaptasi selama 7 hari. Pemeliharaan dilakukan di Universitas Muhammadiyah Malang Kampus 2 dengan suhu ruang 20-25°C. Pemeliharaan dilakukan pada kandang plastik dengan tutup anyaman kawat dan berukuran 30 cm x 45 cm x 15 cm yang diisi dengan 3 ekor tikus. Alas kandang berupa sekam yang diganti secara rutin yaitu dua kali seminggu.

3. Pembagian Kelompok Hewan Uji

Hewan uji tikus dibagi menjadi empat kelompok yaitu; (1) Tikus betina kontrol (tanpa perlakuan), (2) Tikus betina perlakuan jamu sari rapet 0,54 g (dosis 1), (3) Tikus betina perlakuan jamu sari rapet 1,08 g (dosis 2); (4) Tikus betina perlakuan jamu sari rapet 1,62 g (dosis 3).

4. Penimbangan Hewan Coba

Penimbangan hewan coba tikus dilakukan sebelum diberikan perlakuan jamu sari rapet. Penimbangan dilakukan menggunakan neraca digital dengan akurasi 0,1 kg. penimbangan dilakukan di atas timbangan dengan menggunakan baskom sebagai wadah tikus.

5. Pembuatan Dosis Jamu Sari Rapet

Dalam pembuatan jamu sari rapet, jamu ditimbang seberat 0,54 g/200g BB/tikus/hari; 1,08 g/200gBB/tikus/hari; dan 1,62g/200gBB/tikus/hari selama 28 hari. Faktor konversi dosis manusia (70 kg) ke tikus (200 g) adalah 0,018 (Laurence & Bacharach, 1964). Perhitungan dosis penelitian ini bertingkat dengan menggunakan kelipat 2 dari konversi dosis (Kuncarli & Djunarko, 2014). Hitungan dosis jamu sari rapet yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut :

Dosis manusia : satu sendok makan atau setara dengan 15 gram

Konversi dosis manusia ke tikus = dosis manusia \times 0,018

$$= 15 \text{ gram} \times 0,018$$

$$= 0,27 \text{ gram}$$

- Dosis 1 memiliki konsentrasi 2 kali konversi dosis : $2 \times 0,27 \text{ g/200gBB}$
= 0,54 g/200gBB
- Dosis 2 memiliki konsentrasi 4 kali konversi dosis : $4 \times 0,27 \text{ g/200gBB}$
= 1,08 g/200gBB
- Dosis 3 memiliki konsentrasi 6 kali konversi dosis : $6 \times 0,09 \text{ g/200gBB}$
= 1,62 g/200gBB

6. Perlakuan pada Hewan Coba

Pemberian jamu sari rapet dilakukan setiap hari selama 28 hari dengan menggunakan spuit yang sudah dimodifikasi ujungnya yang memiliki tujuan mempermudah jamu masuk ke tubuh tikus. Masing-masing kelompok diberikan dosis yang berbeda-beda dengan memperhatikan bobot pada masing-masing kelompok (Lingga et al., 2014).

Dosis 1 (P1) : $(0,54 \times (245/200))$

: $(0,54 \times 1,22)$

: $0,6588 \text{ g/gBB} \times 3$

: $1,976 \text{ g/gBB}$

Dosis 2 (P2) : $(1,08 \times (213,75/200))$

: $(1,08 \times 1,06)$

: $1,1448 \text{ g/gBB} \times 3$

: $3,4344 \text{ g/gBB}$

Dosis 3 (P3) : $(1,62 \times (190,5/200))$

: $(1,62 \times 0,95)$

: $1,539 \text{ g/gBB} \times 3$

: $4,617 \text{ g/gBB}$

Kelompok kontrol tidak diberikan perlakuan jamu sari rapet.

7. Pemberian Jamu Sari Rapet pada Hewan Uji

Masing-masing dosis jamu ditambahkan air panas sebanyak 3 ml kemudian diaduk dan difilter. Hal ini dikarenakan daya tampung lambung tikus 200 gram adalah 5 ml untuk menghindari terjadinya radang yang disebabkan melebihi daya tampung maksimal (Lingga et al., 2014).

8. Pembedahan dan Pengambilan Sampel Organ Hewan Uji

Pembedahan dilakukan pada hari ke-29 untuk pengambilan organ ginjal dan hati tikus. Sebelum perlakuan pembedahan, tikus dilakukan anestesi terlebih dahulu secara bergantian dengan cara memasukkan tikus ke dalam toples yang berisikan kloroform. Anestesi berlangsung selama ± 20 detik sampai tikus pingsan, kemudian tikus dipindahkan ke baki bedah dengan empat kaki difiksasi ke baki bedah menggunakan jarum pentul. Pembedahan tikus dilakukan dengan menggunakan gunting bedah, kemudian organ ginjal dan hati di simpan dalam botol sampel yang berisi formalin 10% untuk digunakan dalam pembuatan preparat.

9. Pembuatan Preparat Organ Hewan Uji

Pembuatan preparat histologi organ ginjal dan hati melalui langkah sebagai berikut :

a. Pengambilan jaringan

Organ yang sudah direndam dalam formalin 10% selama 1 jam, kemudian di sampel organ ginjal dan hati dipotong dengan ketebalan kurang lebih 2-4 mm.

b. Fiksasi

Potongan sampel organ ginjal dan hati di fiksasi dalam larutan FAA (Formalin, Asam asetat glasial dan Alkohol 70%) selama 24 jam

c. Dehidrasi

Pada tahap ini, sampel organ direndam dalam larutan alkohol 50%, 70%, 80%, 100% masing-masing selama 30 menit.

d. Penjernihan (*Clearing*)

Pada perlakuan ini, bertujuan untuk menarik kadar alkohol setelah didehidrasi dengan menggunakan larutan alkohol : xilol yang memiliki perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-masing selama 30 menit dan dilanjutkan dengan xilol 1 dan 2 selama masing-masing 30 menit.

e. Infiltrasi Parafin (*Embeding*)

Sampel organ direndam dalam larutan xilol : paraffin (9:1) selama 24 jam di dalam inkubator pada suhu 60°C.

f. Pengeblokan (*Blocking*)

Sampel yang telah terinfiltrasi, dimasukkan ke dalam cetakan yang berisi paraffin dan dibiarkan pada suhu kamar hingga dingin dan membeku/mengeras.

g. Pemotongan (*Section*)

Pada tahap ini, sampel yang sudah mengeras dilepaskan dari cetakan dan dipotong dengan ketebalan 4-5 mikron menggunakan mikrotom.

h. Pelarutan Paraffin

Hasil sayatan diletakkan pada gelas objek agar dapat direndam kedalam larutan xilol 1 dan 2 selama 5 menit dan alkohol : xilol (1:3, 3:1, 1:1, 3:1) masing-masing 3 menit.

i. Hidrasi

Hidrasi jaringan dengan alkohol bertingkat (100%, 95%, 70%, 50% dan 30%) masing-masing selama 3 menit.

j. Pewarnaan

Rendam menggunakan aquades selama 3 menit, kemudian pewarnaan HE (*Hematoksin Eosin*) selama 6-7 menit, serta dicuci dengan menggunakan aquades selama 3 menit.

k. Dehidrasi

Sampel yang telah diwarnai direndam dalam alkohol bertingkat dengan konsentrasi 30%, 50%, 70%, 95% dan 100% masing-masing selama 3 menit, kemudian tetesi sampel dengan larutan alkohol : xilol 3:1, 1:1, 1:3 masing-masing selama 2 menit.

l. Penjernihan

Gelas objek yang berisi sampel direndam dalam larutan xilol 1 dan 2 masing-masing selama 5 menit.

m. Penutupan

Sebelum xilol mengering, sampel diletakkan pada kaca preparate dan ditetaskan etelen, kemudian ditutup dengan perlahan menggunakan kaca penutup secara perlahan agar tidak terdapat gelembung udara.

10. Pengamatan Preparat Organ Hewan Uji

Preparat yang dihasilkan diamati menggunakan mikroskop cahaya dan dilakukan dokumentasi pada preparat untuk menilai skor kerusakan pada sampel.

3.7 Teknik Pengumpulan Data

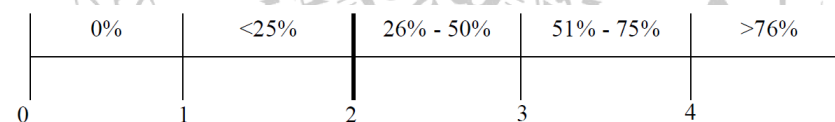
Pemeriksaan histologi bertujuan untuk mengetahui perbedaan struktur jaringan ginjal dan hati yang diberikan perlakuan berbeda-beda. Pemeriksaan histologi organ ginjal dan hati dilakukan menggunakan metode pewarnan

Hematoxylin Eosin dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x kemudian direrata dan dicatat perubahan mikroskopik yang ditemukan pada 5 lapang pandang. Berikut tabel pembacaan preparat histologi ginjal dan hati berdasarkan skoring kerusakan:

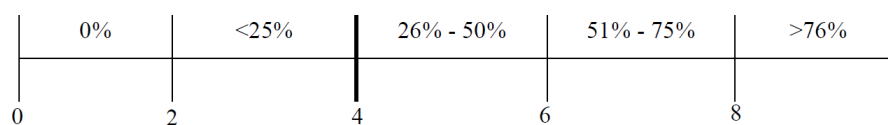
Tabel 3. 3 Skoring kerusakan ginjal

Jenis Kerusakan	Tingkat Kerusakan	Skor
Degenerasi	Tidak terdapat degenerasi sel epitel tubulus ginjal	0
	< 25% degenerasi sel epitel tubulus ginjal	1
	26%-50% degenerasi sel epitel tubulus ginjal	2
	51%-75% degenerasi sel epitel tubulus ginjal	3
	>76% degenerasi sel epitel tubulus ginjal	4
Nekrosis	Tidak terdapat nekrosis pada sel epitel tubulus	0
	<25% nekrosis pada sel epitel tubulus ginjal	2
	26%-50% nekrosis pada sel epitel tubulus ginjal	4
	51%-75% nekrosis pada sel epitel tubulus ginjal	6
	>76% nekrosis pada sel epitel tubulus ginjal	8
Infiltrasi Sel Radang	Tidak ditemukan infiltrasi sel radang	0
	Ditemukan infiltrasi sel radang <25% pada lumen intersitial	1
	Ditemukan infiltrasi sel radang 26-50% pada lumen intersitial	2
	Ditemukan infiltrasi sel radang 51-75% pada lumen intersitial	3
	Ditemukan infiltrasi sel radang >76% pada lumen intersitial	4

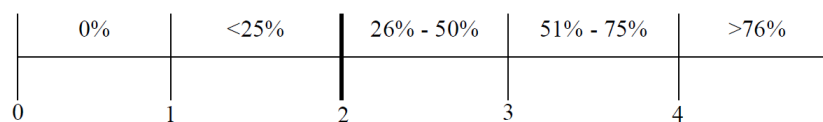
Sumber : (Klopfleisch, 2013)



(a)



(b)



(c)

Gambar 3. 2 Garis kontinum skoring kerusakan ginjal

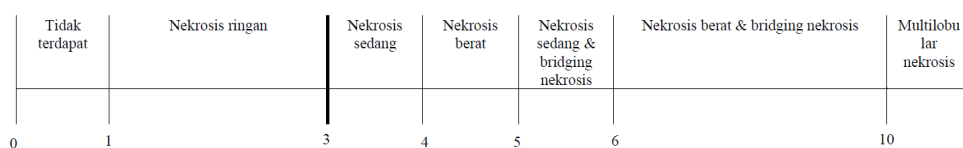
(a) Garis kontinum jenis kerusakan degenerasi; (b) Garis kontinum jenis kerusakan nekrosis; dan (c) Garis kontinum jenis kerusakan infiltrasi sel radang

Sumber : (Klopfleisch, 2013)

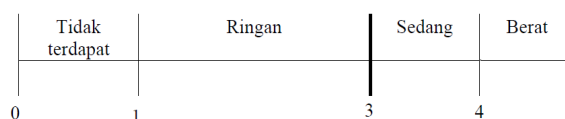
Tabel 3. 4 Skoring kerusakan hati

Bentuk Lesi	Keterangan	Skor
Bridging Nekrosis	Tidak terdapat nekrosis	0
	Nekrosis ringan	1
	Nekrosis terjadi <50% didaerah sekeliling tractus portal (sedang)	3
	Nekrosis terjadi >50% didaerah sekeliling tractus portal (berat)	4
	Nekrosis sedang dan terdapat bridging nekrosis	5
	Nekrosis berat dan terdapat bridging nekrosis	6
Degenerasi dan Fokal Nekrosis	Multilobular nekrosis	10
	Tidak terdapat degenerasi	0
	Degenerasi terdapat <i>acidofil bodies, ballooning</i> degenerasi dan foci nekrotik 1/3 lobulus (ringan)	1
	Degenerasi terdapat <i>acidofil bodies, ballooning</i> degenerasi dan foci nekrotik 1/3-2/3 lobulus (sedang)	3
Infiltrasi Sel Radang (Inflamasi)	Degenerasi terdapat <i>acidofil bodies, ballooning</i> degenerasi dan foci nekrotik >2/3 lobulus (berat)	4
	Tidak terdapat infiltrasi sel radang	0
	Infiltrasi sel radang terjadi <1/3 dari tractus portal (ringan)	1
	Infiltrasi sel radang terjadi 1/3-2/3 dari tractus portal (sedang)	3
Cholangitis	Infiltrasi sel radang terjadi >2/3 dari tractus portal (berat)	4
	Tidak terdapat cholangitis	0
	Ditemukan >1 proliferasi ductus biliaris	1
	Ditemukan 2-3 duktus biliaris	3
	Ditemukan >3 proliferasi ductus biliaris	4

Sumber : (Knodell et al., 1981)



(a)



(b)

Gambar 3. 3 Garis kontinum skoring kerusakan hati

(a) Garis kontinum bentuk lesi bridging nekrosis; dan (b) Garis kontinum bentuk lesi degenerasi dan fokal nekrosis, infiltrasi sel radang, cholangitis

Sumber : (Knodell et al., 1981)

3.8 Teknik Analisis Data

Data yang berupa histologi ginjal dan hati akan dianalisis menggunakan uji statistik SPSS (*Statistical Product of Service Solution*). Uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji *Saphiro-Wilk* untuk menilai terdistribusi secara normal atau tidak. Data yang terdistribusi normal akan dilanjutkan dengan uji parametik *One-Way ANOVA* untuk mengetahui apakah ada atau tidaknya pengaruh dari perlakuan yang diberikan terhadap kelompok dan dilanjutkan dengan *pos hoc duncan*, sedangkan apabila didapatkan data yang tidak terdistribusi secara normal maka akan dilanjutkan dengan uji *Krustal-Wallis*.

