

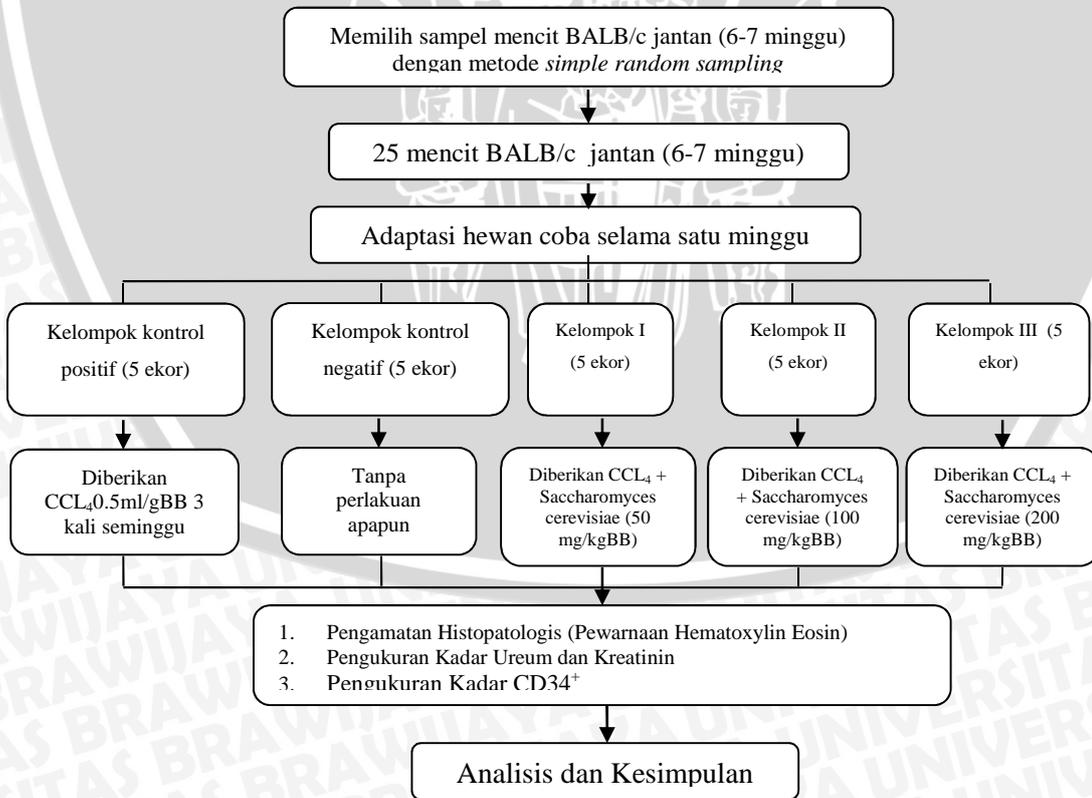
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Rancangan penelitian yang dipakai adalah rancangan acak kelompok (RAK). Induksi CCL<sub>4</sub> (*carbon tetrachloride*) yang bertujuan untuk menginduksi terjadinya gagal ginjal kronis mengacu pada penelitian Juarez *et al.*(2008) yaitu 0,5 ml/g BB. Dosis pemberian ragi mengacu pada penelitian Robak *et al.*(2009) yaitu 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, dan 200 mg/kg BB (Juarez *et al.*, 2008; Robak *et al.*, 2009).

4.1.1 Skema Alur Penelitian



Gambar 3. Skema Alur Penelitian



#### 4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah model mencit Balb/C jantan berusia 6-7 minggu. Pemilihan mencit jantan ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Jong *et al* (2009). Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Anshori, M., 2008):

$$(t-1)(r-1) = 15$$

t : jumlah perlakuan, r : jumlah ulangan

Pada penelitian ini t = 5 sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$(5-1)(r-1) = 15; r-1 = 15:4; r = 3.75 + 1 = 4.75$$

Dibesarkan menjadi 5 pengulangan.

Jumlah kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah 5 kelompok. Karena jumlah pengulangan dalam tiap kelompok sebanyak 5 pengulangan, mencit Balb/c yang digunakan sebanyak 25 ekor. Berikut ini adalah pembagian kelompok perlakuan:

1. Kelompok kontrol negatif : mencit sehat tanpa diberikan perlakuan apapun
2. Kelompok kontrol positif : mencit diinduksi CCL<sub>4</sub> tanpa diberikan ragi
3. Kelompok P1 : mencit diinduksi CCL<sub>4</sub> dan diberikan ragi *Saccharomyces cerevisiae* dengan dosis 50 mg/kg BB
4. Kelompok P2 : mencit diinduksi CCL<sub>4</sub> dan diberikan ragi *Saccharomyces cerevisiae* dengan dosis 100 mg/kgBB
5. Kelompok P3 : mencit diinduksi CCL<sub>4</sub> dan diberikan ragi *Saccharomyces cerevisiae* dengan dosis 200 mg/kgBB

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel bebas

1. Pemberian  $\text{CCL}_4$  sebesar 0,5 ml/ gram BB
2. Pemberian Ragi *Saccaromyces cerevisiae* dalam berbagai dosis

#### 4.3.2 Variabel terikat

Histopatologi anatomi jaringan glomerulus ginjal

### 4.4 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Alokasi waktu untuk penyusunan proposal adalah bulan September 2011. Pelaksanaan penelitian sampai pembuatan laporan hasil penelitian adalah mulai bulan Maret sampai Juni 2012.

### 4.5 Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

#### 1. Perawatan Mencit

Bahan dan alat yang diperlukan adalah kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan *cornfeed* (makanan standar mencit), dan alkohol 70% untuk memandikan tikus yang disemprotkan tiap hari.

#### 2. Alat dan Bahan Untuk Induksi Mencit Model Gagal Ginjal Kronis

Sprit injeksi intraperitoneal dan  $\text{CCL}_4$ .

#### 3. Pemberian Ragi *Saccharomyces cerevisiae*

Aquades, ragi murni, sonde.

#### 4. Pembedahan Tikus

Gunting bedah, sterofoam 2 buah, pinset 2 buah, kapas, jarum pentul 2 set, kloroform 20 ml, spuit insulin 1 ml 30 buah, formalin 10% 200 ml, wadah plastik dan tutup 25 buah, alkohol, vacuotainer 25 buah.

5. Pewarnaan Histopatologi Ginjal dengan Hematoxylin Eosin

Preparat, mikrotom, slide glass, mikroskop dengan pembesaran 400x, 85% propylene glycol solution, 100% propylene glycol solution, 0,5%, 10% formalin, Meyer's hematoxylin solution, glycerin jelly dan aquades.

#### 4.6 Definisi Istilah/Operasional

1. Ragi yang digunakan yaitu ragi *Saccaromyces cerevisiae* jenis yang digunakan untuk pembuatan roti. Ragi ini bisa dibeli dimana saja. Selanjutnya ragi ini dihomogenisasikan dahulu dengan aquades kemudian diberikan dengan disondekan pada hewan coba.
2. Hewan coba yang digunakan adalah model mencit Balb/C karena galur ini mampu memperagakan status imunitas manusia. Mencit Balb/C diperoleh dari laboratorium Farmakologi.
3. *Carbon tetrachloride* ( $\text{CCL}_4$ ) di dapat dari lab farmakologi. Merupakan zat yang terbukti mampu menginduksi kerusakan ginjal (Juarez *et al*, 2008).

#### 4.7 Prosedur Penelitian/ Pengumpulan Data

1. Persiapan Hewan coba

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan, alkohol 70%, hewan uji, dan seleksi mencit (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan). Mencit diadaptasikan di dalam laboratorium farmakologi selama tujuh hari dan dibagi enam kelompok.

2. Induksi kerusakan model gagal ginjal kronis

Induksi mencit model gagal ginjal kronis dengan CCL<sub>4</sub> sebanyak 0,5 ml/g BB. Pertama-tama, tikus dibuat gagal ginjal akut dengan diinduksi CCL<sub>4</sub> selama satu minggu. Sebelumnya mencit dipuasakan semalam, lalu diinjeksikan CCL<sub>4</sub> intraperitoneal. Kemudian, mencit yang sudah gagal ginjal akut diteruskan dibuat menjadi gagal ginjal kronis dengan injeksi CCL<sub>4</sub> tiga kali seminggu selama enam minggu (Juarez, 2008).

3. Pemberian Ragi *Saccharomyces cerevisiae* pada tikus

Ragi dihomogenisasi terlebih dahulu dengan aquades kemudian diberikan disondekan pada mencit. Pemberian ragi dilakukan selama 6 minggu dengan cara disondekan pada mencit.

4. Pembedahan Mencit

Pembedahan dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Taruh mencit yang sudah diberi anestesi di atas sterofoam, fiksasi, lalu bedah mulai dari perut. Ambil darahnya terlebih dahulu dengan spuit 1 ml melalui jantung. Setelah itu, ambil organ heparnya dan fiksasi ke dalam formalin 10%.

5. Pengukuran Ureum dan Kreatinin dalam Darah Mencit

Setelah pemberian ragi selama 6 minggu, mencit dieuthanasia kemudian diambil darahnya untuk mengecek kadar kreatinin. Cek kreatinin menggunakan serum elektrolit. Cek ureum menggunakan metode urinalisis.

6. Pengukuran peningkatan CD34+ Menggunakan Flowcytometri

Sentrifugasi preparasi *whole blood* dalam suhu 4<sup>0</sup>C, dengan kecepatan selama 15 menit. Hasil sentifugasi berupa endapan sel dicampur dengancytoperm/cytofix sejumlah 2 kali dari jumlah sel yang didapat. Campuran sel dan cytoperm/cytofix disentrifugasi sehingga didapatkan sup dan pellet. Kemudian ditambahkan *BD wash* pada pelet sejumlah 4 kali dari

jumlah sel yang didapat disentrifugasi pertama. Sentrifugasi campuran tersebut kemudian tambahkan lisis buffer sejumlah 2 kali jumlah sel awal yang didapat. Setelah itu tambahkan *antibody* terlabel untuk setiap sampel, lima tabung disiapkan dan diproses secara paralel. (1) Perwarnaan tunggal dengan CD34 PE ditambahkan ke dalam *wash tube*. (2) Pewarnaan ganda dengan CD34 PE dan CD45 PerCP-*wash tube*. (3) Pewarnaan ganda dengan CD34 PE dan CD45 PerCP-*trucount tube*. (4) Reagen isotop kontrol – IgG1 PE dan CD45 perCP-*wash tube*. (5) Reagen isotop kontrol –IgG1 PE dan CD45 perCP-*trucount tube*. Seluruh sampel kemudian disimpan dalam suhu 4°C dalam kondisi gelap dan dianalisa menggunakan flowcytometri selama 1 jam.

#### 7. Pembuatan Preparat Histologi Ginjal

Ginjal diambil melalui pembedahan mencit. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan metode paraffin. Fiksasi dilakukan dengan merendam jaringan ginjal tikus dalam formalin 10% selama sehari semalam (24 jam) kemudian dilanjutkan dengan tahap pencucian menggunakan air minimal 1,5 jam. Jaringan dimasukkan dalam alkohol 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 99 % selama 1 jam dan alkohol absolut selama 2x1 jam lalu dalam campuran xylol : alkohol absolut = 1:1 selama 0,5jam, dan xylol PA selama 2x30 menit. Jaringan dipotong setipis mungkin dan dimasukkan ke dalam *melted* paraffin : xylen = 1:1 selama 1 jam, paraffin (54-58) selama 2x1 jam. *Melted* paraffin dimasukkan ke dalam cetakan berbentuk kubus lalu ditempatkan pada posisi yang diinginkan dalam paraffin tersebut kemudian disiram lagi dengan *melted* paraffin secukupnya. Blok paraffin dibiarkan sampai dingin dan dikeluarkan dari cetakannya. Bagian blok yang dibelakang dilekatkan pada kayu pemegang blok pada mikrotom kemudian posisi indikator yang menunjukkan

ketebalan pemotongan (6-8 mikrometer) diatur. Hasil pemotongan saling bersambungan membentuk pita, ujung pita diangkat dengan kuas dan direntangkan diatas permukaan air hangat (30-40°C) secara lembut dan tanpa lipatan. Gelas objek dilapisi dengan lapisan putih telur : gliserol = 1:1 sebagai lapisan tipis dan biarkan kering (untuk merekatkan sediaan). Pita paraffin dan pita tersebut diangkat dengan gelas objek. Gelas objek diletakkan di atas steamer hangat (agar pita mengembang dan lurus tanpa lekukan) kemudian dibiarkan kering dan sediaan melekat erat (1 hari). Jaringan yang berada di gelas objek dimasukkan ke dalam xylol selama 3x5 menit. Lalu dikeringkan. Hasil diamati pada mikroskop untuk mengetahui progresivitas perbaikan sel nefron.

#### 4.8 Analisis Data

Hasil pengukuran tingkat morfologi sel ginjal kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 17.0 dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut : Uji normalitas data, Uji homogenitas varian, Uji One-way ANOVA, Post hoc test (uji Least Significant Difference) dan Uji korelasi Pearson.