

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian laboratorik in vitro dengan menggunakan bahan biologis tersimpan yaitu organ ginjal tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang telah diberikan perlakuan ovariektomi pada penelitian sebelumnya.

Perlakuan terhadap hewan coba pada penelitian ini dengan dilakukan tindakan ovariektomi untuk menciptakan kondisi hipoestrogen yaitu terjadi pada 28 hari pasca ovariektomi (Wiyasa, 2012) hal ini ditandai dengan kenaikan pH vagina sampai lebih dari 7,3 (Yuliani, 2014). Dilanjutkan dengan pemberian ekstrak kacang tunggak dengan berbagai dosis yaitu 1,25 mg/kgBB, 2,5 mg/kgBB, dan 5 mg/kgBB per hari selama 30 hari (Khusniati *et al.* 2014; Azizah *et al.* 2014; Yulinda *et al.* 2014).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Tempat Penelitian

- Pemeliharaan tikus, tindakan ovariektomi dan terminasi di Laboratorium Farmakologi FKUB
- Pengekstrakan kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA UB
- Pemeriksaan kandungan ekstrak kacang tunggak dengan metode LC-MS di Polinema (Tian, 2004)

- d. Pembuatan preparat dengan pewarnaan HE di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB
- e. Pengukuran volume korteks ginjal di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB.

4.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari Januari 2016 sampai April 2016

4.3 Bahan dan Alat

4.3.1 Bahan Penelitian

a. Sampel dan Replikasi

Sampel pada penelitian ini adalah organ ginjal tikus (*Rattus Norvegicus Galur Wistar*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya dan diberi perlakuan. Setelah itu, organ ginjal diproses di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya untuk menjadi preparat ginjal.

b. Besar sampel

Besar sampel untuk tiap perlakuan adalah 6 organ. Total jumlah sampel penelitian sebanyak 30 organ. Sampel dibagi 5 kelompok yang terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan, yaitu :

- 1) Kelompok kontrol (-) : kelompok tikus yang tidak diovariectomi dan tidak diberi ekstrak *Vigna unguiculata*
- 2) Kelompok kontrol (+) : kelompok tikus model ovariektomi dan tidak diberi ekstrak *Vigna unguiculata*
- 3) Kelompok perlakuan 1 : kelompok tikus yang diovariectomi dan diberi ekstrak *Vigna unguiculata* dengan dosis 1,25 mg/kgBB per hari selama 30 hari

- 4) Kelompok perlakuan 2 : kelompok tikus yang diovariectomi dan diberi ekstrak *Vigna unguiculata* dengan dosis 2,5 mg/kgBB per hari selama 30 hari
- 5) Kelompok perlakuan 3 : kelompok tikus yang diovariectomi dan diberi ekstrak *Vigna unguiculata* dengan dosis 5 mg/kgBB per hari selama 30 hari

4.3.2 Bahan dan Alat Penelitian

a. Alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba

1) Kandang

- a) Ukuran Kandang : berupa box plastik berukuran 40 cm x 30 cm x 20 cm, ditutup dengan kawat berjaring.
- b) Jumlah kandang : pada masa aklimatisasi, kandang sebanyak 5 buah diisi dengan sekam sebagai alas. Masing-masing kandang ditempati 2 tikus. Setelah ovariektomi, tikus dipisahkan dalam kandang masing-masing 1 kandang ditempati 1 tikus.

2) Tempat minum di masing-masing kandang

b. Alat Menimbang Tikus

- 1) Timbangan atau neraca digital
- 2) Log Book

c. Bahan dan Alat Ekstrak Kacang Tunggak

1. Bahan :

- a. 10 kg kacang tunggak yang diperoleh dari petani I Wayan Kanca di daerah Nusa Penida - Bali
- b. Metanol for Analisis

2. Alat :

- a) Timbangan
- b) Pengaduk
- c) Blender
- d) Kertas saring *Whatman*
- e) *Rotary evaporator*
- f) Oven

d. Alat dan Bahan Ovariektomi

1) Alat :

- a) 1 set alat bedah termasuk pisau scalpel no.11
- b) Spuit 1 cc
- c) Meja operasi kecil
- d) Baki plastik
- e) Sarung tangan
- f) Duk steril
- g) Korentang
- h) Bengkok
- i) Kandang pemulihan

2) Bahan :

- a) Agen anestesi (kombinasi :Ketamin 80 mg/kg dan xylazine 10 mg/kg)
- b) etanol
- c) povidon iodin
- d) Benang cat gut (cromik 3/0 dan silk3/0)
- e) Kassa steril

e. Alat dan Bahan untuk Swab Vagina

- 1) Alat : pH indikator strip MERCK, *cotton swab*
- 2) Bahan : sekret mukosa vagina yang berada di introitus vagina tikus

f. Alat Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak kepada Hewan Coba

- 1) Botol dengan penutup
- 2) Spuit 1 ml
- 3) Spuit yang ujungnya dipasang platina (sonde)

g. Alat untuk Pengambilan Jaringan Uterus Tikus

- 1) Alat bedah minor (gunting, pinset, klem, pemegang jaringan)
- 2) Wadah kecil sebagai tempat penyimpanan jaringan sementara sebelum dibuat preparat histopatologi
- 3) Papan untuk meja pembedahan
- 4) Handscon
- 5) Buffer formalin 10%

h. Alat dan Bahan Pembuatan Sediaan Histopatologi Ginjal

- 1) Bahan :
 - a. Sediaan organ ginjal tikus
 - b. Formalin 10%
 - c. Cat utama Harris Hematoksilin
 - d. Cat pembanding Eosin 1%
 - e. Amonia air
 - f. Alkohol asam
 - g. Xylo
 - h. Alkohol (70%, 80%, 96%, Absolut)

- i. Entellan
 - j. Parafin Cair
 - k. Aquades
- 2) Alat :
- a) Mikrotom
 - b) Pisau pemotong preparat gross
 - c) *Object glass*
 - d) *Cover glass*
 - e) *Tissue Tex Processor*
 - f) Oven
 - g) Kaset

- i. Alat Pengukuran Volume Korteks Ginjal

Dot slide mikroskop pencahayaan Olympus XC 10 dengan *software Olyvia*

4.4 Definisi Operasional dan Variabel Penelitian

4.4.1 Definisi Operasional

- b. Ovariectomi

Ovariectomi dilakukan dengan pengambilan organ ovarium kanan dan kiri tikus yang bertujuan untuk menyebabkan kondisi hipoestrogen.

- a. *Vigna unguiculata* merupakan tanaman Kacang Tunggak yang dipanen saat tua dan berasal dari daerah Nusa Penida-Bali.

- b. Pemberian ekstrak kacang tunggak :

Pemberian ekstrak kacang tunggak dengan dosis 1,25 mg/kgBB, 2,5 mg/kgBB dan 5 mg/kgBB per hari selama 30 hari dimulai saat tikus telah

mengalami kondisi hipoestrogen (diperiksa dengan Pap Smear) diberikan per oral (Khusniyati et al, 2014).

Skala: Rasio

c. Volume korteks ginjal

Pengukuran volume korteks ginjal dilakukan dengan metode Cavalieri (Mansouri et al, 2016). Metode Cavalieri adalah metode yang digunakan untuk menghitung volume dengan cara mengkalikan luas permukaan dengan ketebalan irisan organ. Luas permukaan organ dapat dihitung menggunakan Software OlyVIA setelah preparat discan dengan Mikroskop Dot Slide di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Skala : Rasio

4.4.2 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Pemberian ekstrak kacang tunggak dalam dosis 1,25 mg/kgBB; 2,5 mg/kgBB; 5 mg/kgBB

b. Variabel Tergantung

Volume korteks ginjal *Rattus norvegicus* galur *Wistar*

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Prosedur Pembuatan Spesimen Jaringan Ginjal

1) Pembuatan blok parafin

a) Jaringan segar

b) Jaringan ginjal tikus direndam dalam larutan fiksatif berupa formalin

10% minimal 24 jam

- c) Jaringan dipotong gross dengan ketebalan 2-3 mm
 - d) Prosesing jaringan dengan menggunakan metode *autoprocessing* dengan alat *Sakura Tissue Tex Processor*
 - e) Direndam dalam *xylol*, kemudian paraffin sebanyak 3 kali, kemudian dilanjutkan dengan embedding dengan mencelupkan jaringan dalam paraffin cair yang telah dituang dalam wadah.
 - f) Setelah beberapa saat paraffin akan memadat dan jaringan ginjal tikus berada dalam blok paraffin.
 - g) Preparat pada blok paraffin hasil *embedding* dimasukkan pada penjepit (*block holder*) mikrotom dan diatur kesejajaran permukaan potong dengan mata pisau *mikrotom*.
 - h) Jaringan diiris dengan ukuran 3-4 μm .
 - i) Hasil potongan yang bagus akan menghasilkan bentuk potongan seperti pita. Irisan diambil dengan kuas dan dimasukkan air (suhu ruang) untuk membuka lipatan yang mungkin terjadi pada preparat.
 - j) Hasil irisan dipindahkan dengan kuas kedalam air hangat 38-40°C untuk meluruskan kerutan halus yang ada.
 - k) Irisan yang terentang sempurna diambil dengan *cover slip*.
 - l) Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan diatas *hot plate* 38-40°C sampai kering, lalu preparat disimpan dalam inkubator suhu 38-40°C selama 24 jam.
- 2) Deparafinisasi dan Rehidrasi
 - a) Preparat dicelup dalam *xylol* sebanyak 3 kali, didiamkan, masing-masing selama 15 menit.

- b) Preparat dicelup ke larutan alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, 30%), dan *aquades* secara berurutan masing-masing selama 5 menit.
 - c) Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit.
 - d) Permeabilisasi Sel
 - e) Cuci sel 1 kali dengan PBS.
 - f) Inkubasi sel pada 3% H₂O₂ dalam PBS selama 10 menit suhu ruang.
 - g) Cuci sel 3 kali dengan PBS
- 3) Pewarnaan Hematoksisilin-Eosin(HE)
- a. Cat utama Harris Hematoksisilin selama 10-15 menit
 - b. Cuci dengan air mengalir selama 15 menit
 - c. Alkohol asam 1% 2-5 celup
 - d. Cat pembanding Eosin 1% selama 10-15 menit
- 4) Proses dehidrasi:
- a. Alkohol 70% selama 3 menit
 - b. Alkohol 80% selama 3 menit
 - c. Alkohol 96% selama 3 menit
 - d. Alkohol Absolut selama 3 menit
- 5) Proses penjernihan dan mounting:
- a. Preparat dicelupkan pada xylol 2x60 menit
 - b. Preparat dilakukan mounting dengan menggunakan entellan
 - c. Preparat siap untuk discan dengan scan dot

4.5.6 Prosedur Evaluasi

- 1) Disiapkan preparat sampel
- 2) Preparat sampel telah diwarnai dengan HE

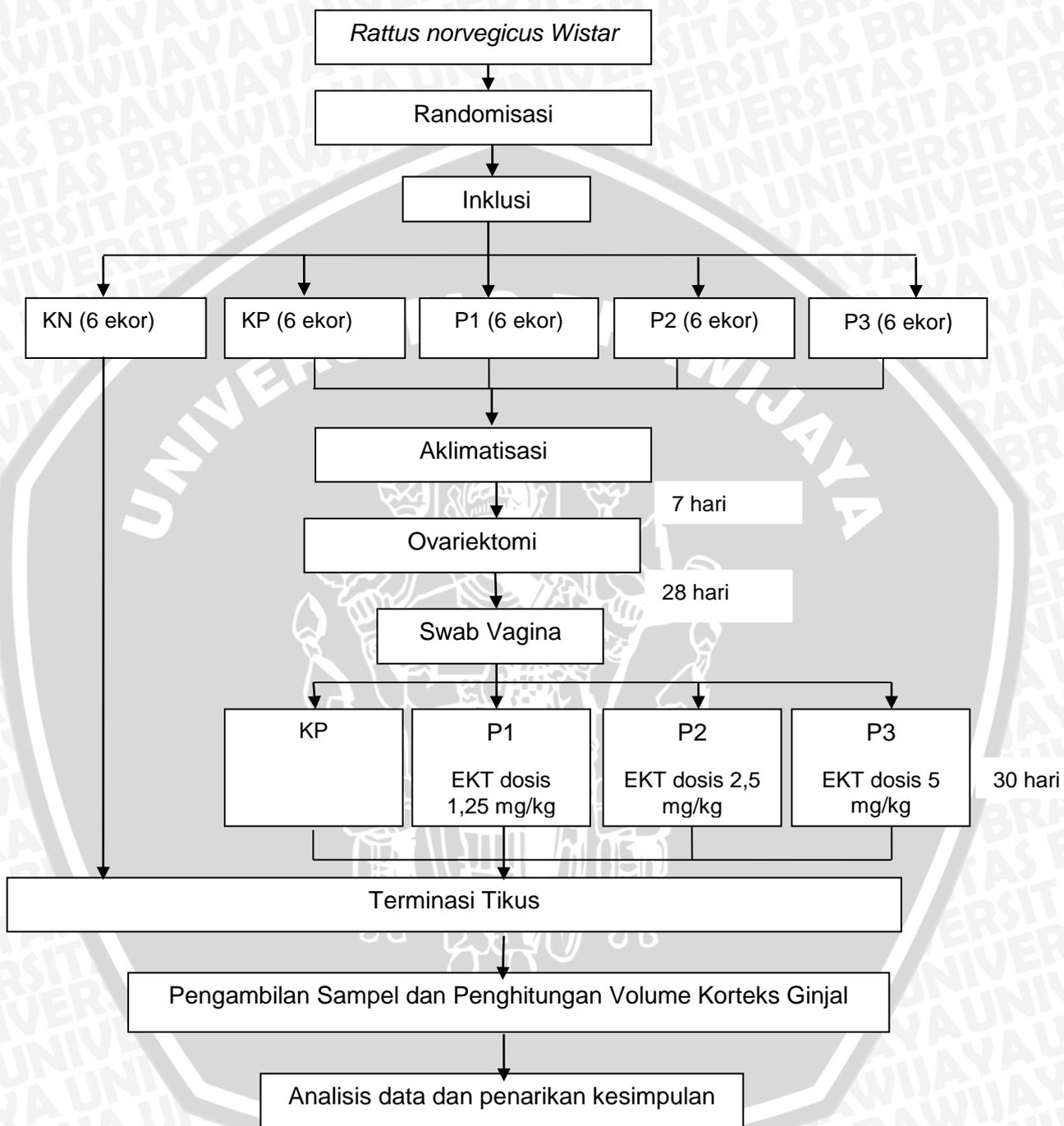
- 3) Dilakukan scan pada preparat sampel dengan scan dot
- 4) Diukur luas area korteks ginjal pada preparat sampel dengan software
- 5) Volume korteks ginjal didapatkan dengan menggunakan metode Cavalieri(Nyengard,1999). Metode Cavalieri adalah perhitungan volume dengan perkalian luas area korteks ginjal dengan ketebalan irisan sampel. Luas area korteks ginjal dapat diukur dengan Software OlyVIA yang ada di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB.

4.6 Analisis Data

Data yang dihasilkan dari pengukuran volume korteks ginjal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan kemudian dianalisis secara statistik ANOVA dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Sebelumnya dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas pada data. Data yang berdistribusi normal dan homogen adalah syarat dilakukan uji ANOVA. Jika data tidak memenuhi persyaratan normalitas dan homogenitas berdasarkan uji statistik, maka akan dilakukan uji Kruskal Wallis. Berikut urutan uji statistik yang dilakukan :

- a. Uji normalitas dan homogenitas untuk mengetahui distribusi data.
- b. Uji ANOVA atau Kruskal Wallis untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Vigna Unguiculata* terhadap volume korteks ginjal *Rattus norvegicus*.
- c. Korelasi Spearman digunakan untuk mengetahui apakah pemberian ekstrak kacang tunggak berbagai dosis berpengaruh bermakna terhadap variabel tergantung.

4.7. Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian