

BAB 4

METODE PENELITIAN

4. 1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Rancangan penelitian yang dipakai adalah rancangan acak kelompok (RAK). Induksi *aristolochic acid* (AA) secara intraperitoneal (i.p) bertujuan untuk menginduksi terjadinya *aristolochic acid nephropathy* (AAN) untuk menjadi model penyakit ginjal kronis AA diberikan dalam dosis 2,5 mg/kg BB selama lima hari seminggu dalam 2 minggu (Sato et al, 2004). Dosis pemberian ekstrak *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* mengacu pada penelitian metabolisme lipid pada mencit model atherogenic diet yang dilakukan oleh Robak et al. (2009).

4. 2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah model mencit balb/c jantan berusia 8 minggu. Pemilihan mencit jantan ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Huang et al. (2013). Pada penelitian ini, terdapat kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang bertujuan untuk membuat homogen sampel penelitian yang akan digunakan. Hal tersebut dikarenakan homogenitas sampel penelitian merupakan syarat yang digunakan pada penelitian eksperimental untuk mencegah terjadinya bias.

Berikut ini merupakan kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang digunakan:

Kriteria inklusi:

1. Mencit strain balb/c
2. Mencit berwarna bulu putih, bergerak aktif, tingkah laku normal, dan badan sehat

Kriteria eksklusi:

1. Mencit yang selama penelitian tidak mau makan dan minum
2. Mencit yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

Pada penelitian ini, dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok yang bertujuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah menggunakan rumus sebagai berikut:

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

t : jumlah perlakuan, r : jumlah ulangan

Pada penelitian ini $t = 5$ sehingga jumlah pengulangan adalah:

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

$$r-1 \geq 15:4$$

$$r = 3,75 + 1 = 4,75$$

Berdasarkan perhitungan di atas dapat disimpulkan bahwa jumlah pengulangan yang diperlukan adalah $4,75 =$ dibulatkan menjadi 5 pengulangan yang

terdiri dari kontrol negatif, kontrol positif, kelompok A (P1), kelompok B (P2), dan kelompok C (P3).

4. 3. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium farmakologi, dan laboratorium patologi anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Maret sampai dengan Desember 2015.

4. 4. Variabel Penelitian

Variabel penelitian terikat atau variabel dependen dalam penelitian ini adalah serum kreatinin. Serum kreatinin merupakan senyawa yang berasal dari reaksi dehidrasi nonenzimatik kreatin yang terjadi di otot rangka dan jaringan syaraf.

Variabel kendali atau variabel independen dalam penelitian ini adalah *Saccharomyces Cerevisae*. Variabel kendali atau variabel independen adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti dan berhubungan langsung dengan perubahan yang terjadi pada variabel terikat atau variabel dependen. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah pemberian *Saccharomyces cerevisae*.

Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah 5 perlakuan sehingga Mencit Gagal Ginjal Kronik dibagi menjadi 5 kelompok. Pembagian kelompok dilakukan berdasarkan penginduksian gagal ginjal kronik dan pemberian *Saccharomyces cerevisae*.

Tabel 4.1. Pembagian Kelompok Mencit Kontrol dan Perlakuan

No	Kelompok	Perlakuan yang diberikan
1	Kontrol negatif	Tidak diberikan perlakuan apapun
2	Kontrol positif	Injeksi <i>aristolochic acid</i> dan tanpa diberikan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3	Kelompok P1	Injeksi <i>aristolochic acid</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 50 mg/kgBB
4	Kelompok P2	Injeksi <i>aristolochic acid</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 100 mg/kgBB
5	Kelompok P3	Injeksi <i>aristolochic acid</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 200 mg/kgBB

4. 5. Definisi Operasional

a. Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit balb/c jantan berusia 8 minggu.

b. Induksi Gagal Ginjal Kronik

Induksi Gagal Ginjal Kronik pada hewan coba menggunakan *aristolochic acid* (AA). Dosis pemberian mengacu pada penelitian Sato *et al.* (2004) yaitu dengan dosis 2,5 mg/kg BB sekali setiap hari selama 5 hari dalam seminggu dan dilakukan selama 2 minggu secara intraperitoneal (i.p).

c. Ekstrak *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae dengan dosis 50 mg/kgBB; 100 mg/kgBB; 200 mg/kgBB untuk kelompok I, II, dan III dilarutkan dalam aquades. Ragi diekstrak menggunakan metode maserasi kemudian diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung mencit. Pemberian ekstrak *S.cerevisiae* dilakukan selama 2 minggu.

d. Bagian yang diukur diambil dari darah mencit.

4. 6. Bahan dan Alat

1. Perawatan mencit model gagal ginjal kronis

Alat : kandang mencit gagal ginjal kronis, tempat minum, timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, dan nampan

Bahan : pelet, terigu, air, dan sekam

2. Penginduksian gagal ginjal kronis pada hewan coba

Alat : spuit insulin, kassa, alkohol

Bahan : aristolochic acid

3. Pembuatan Larutan *Saccharomyces cerevisiae*

Alat : gelas erlenmeyer, timbangan

Bahan : *Saccharomyces cerevisiae*, akuades

4. Pemberian Larutan *Saccharomyces cerevisiae*

Alat : sonde makan mencit model gagal ginjal kronis

Bahan : larutan *Saccharomyces Cerevisiae*

5. Pengukuran kadar kreatinin serum pada mencit model gagal ginjal kronis

Alat : centrifuge, pipet, spektrofotometri

Bahan : sediaan darah hewan coba

4. 7. Prosedur Penelitian

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 galur B6/C₃H₆, dan seleksi mencit (usia 6-8 minggu, dengan berat badan 20-25 g, jenis kelamin jantan). Mencit diadaptasikan di dalam laboratorium parasitologi selama tujuh hari dan dibagi lima kelompok.

2. Induksi kerusakan model penyakit ginjal kronis

Induksi mencit model penyakit ginjal kronis dengan AA sebanyak 2,5 mg/kg BB yang dilarutkan kedalam minyak jagung. Mekanisme AA yakni menginduksi fibrosis interstitial ginjal dengan kerusakan pada pembuluh darah sehingga akan menyebabkan iskemia dan fibrosis interstitial (Broe, 2014). Induksi dalam waktu yang lama menyebabkan kronik nekrosis. Pertama-tama, mencit dibuat menjadi penyakit ginjal kronis dengan diinduksi AA sekali setiap hari, lima hari dalam seminggu selama 2 minggu secara intraperitoneal (i.p) (Sato *et al*, 2004).

3. Pembuatan dan Pemberian Ekstrak *Beta Glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* pada mencit

Ragi *Sachharmonyces cerevisiae* merk mauripan, dihaluskan menggunakan mortar dan ditimbang 100 gr . Kemudian dimasukkan kedalam *beaker glass* dan

ditambah dengan pelarut etanol 95 % sebanyak 900ml. Diirendam (maserasi) selama 3 hari. Dipasang evaporator pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30°-40° terhadap meja. Hasil maserasi dimasukkan dalam labu ekstraksi. Satu set alas evaporasi diletakkan sedemikian rupa sehingga sebagian labu ekstraksi terendam aquades pada *water bath*. *Water bath* dihubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhunya sampai 70° C (sesuai dengan titik didih etanol). Kemudian ditunggu proses berjalan (pengembunan dan pemisahan di pendingin) sampai hasil evaporasi tersisa dalam labu ekstraksi. Hasil evaporasi berupa cairan kental sebanyak 60 gram. Ekstrak dihomogenisasi terlebih dahulu dengan menggunakan aquades yang telah disesuaikan dengan kebutuhan minimum kelompok mencit yang menghasilkan perbandingan (1ml aquades : 12,5 mg ekstrak)(lampiran) kemudian diberikan disondekan pada mencit sesuai perhitungan (lampiran). Pemberian ekstrak *S.cerevisiae* dilakukan selama 2 minggu dengan cara disondekan pada mencit siang hari.

4. Pengambilan Sampel Darah

- Pembedahan dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu.
- Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup.
- Mencit yang sudah diberi anestesi diletakkan di atas steroform, difiksasi, lalu dibedah mulai dari perut.
- Diambil darahnya terlebih dahulu dengan spuit 1 ml melalui jantung.
- Setelah itu, diambil organ ginjalnya dan dimasukan ke tabung berisi cairan PBS

5. Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal

Ginjal diambil melalui pembedahan mencit. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan metode paraffin.

- Ginjal difiksasi dengan merendam jaringan ginjal mencit dalam formalin 10% selama sehari semalam (24 jam).
- Dicuci menggunakan air minimal 1,5 jam.
- Jaringan dimasukkan dalam alkohol 70% selama 1 jam
- Jaringan dimasukkan dalam alkohol 80% selama 1 jam
- Jaringan dimasukkan dalam alkohol 99 % selama 1 jam
- Jaringan dimasukkan dalam alkohol absolut selama 2x1 jam
- Jaringan dimasukkan dalam campuran xylol : alkohol absolut = 1:1 selama 0,5jam, dan xylol PA selama 2 x 30 menit.
- Jaringan dipotong setipis mungkin dan dimasukkan ke dalam *melted* paraffin : xylen = 1:1 selama 1 jam
- Jaringan dimasukkan dalam 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.
- Perwanaan menggunakan perwanaan Hematoksilin eosin (HE).

6. Pengamatan Hasil Histopatologi

Pengamatan pada bagian kortek dengan perbesaran 400x pada setiap slide.

7. Pengukuran Kadar Kreatinin Serum dengan Spektrofotometri

Darah didiamkan selama 15 menit lalu disentrifus selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm. Bagian yang jernih (serum) dipisahkan dan diambil untuk diperiksa kadar kreatininnya. Serum dipipet sebanyak 50 ul dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dicampur dengan larutan 1 ml larutan working reagen yang terdiri dari 4 bagian reagen 1 dan 1 bagian reagen 2 lalu diaduk dengan alat vorteks. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri.

8. Pengolahan dan Analisis Data

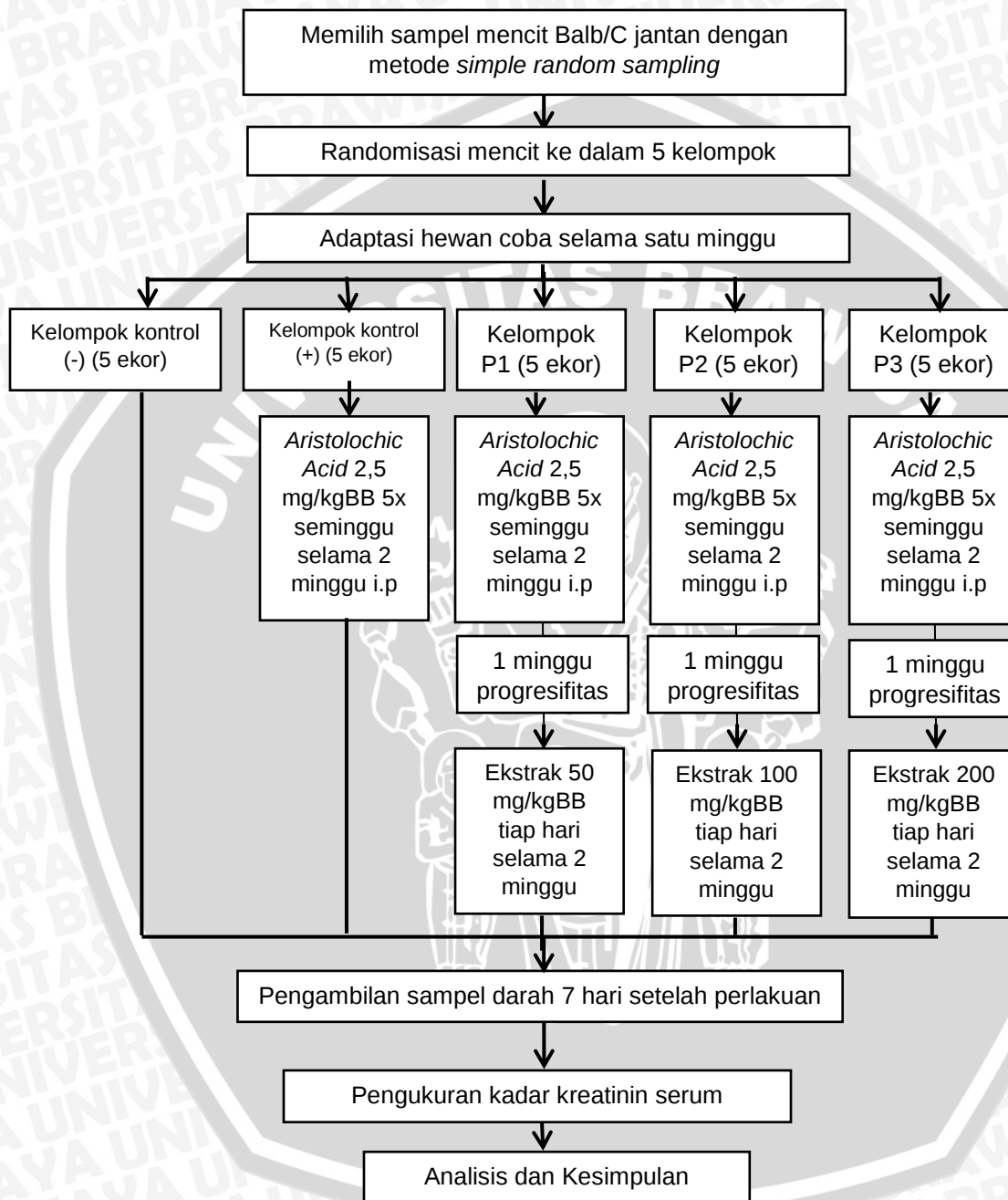
Hasil pengukuran penurunan kadar kreatinin serum, kontrol serta perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16.0 dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$)

4. 8. Pengolahan Data

Hasil perhitungan dianalisa secara statistik menggunakan *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS)* dengan menggunakan uji sebagai berikut (Sugiyono, 2010).

1. Uji Normalitas (uji Kolmogorov-Smirnov): bertujuan untuk menguji apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok memiliki sebaran normal. Jika sebaran data normal, analisa dilanjutkan dengan uji ANOVA. Jika sebaran data tidak normal, digunakan uji non parametrik.
2. Uji homogenitas varian : bertujuan untuk menguji apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok memiliki varian homogen. Jika varian homogen, analisa dilanjutkan dengan anova. Jika varian tidak homogen, maka menggunakan:
 - a) Uji *One-way Anova*: bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata masing-masing kelompok. Uji alternatif (non parametrik): uji Kruskal-Wallis.
 - b) Analisis *Post Hoc (Tukey HSD)*: bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes Anova. Analisis *post hoc* untuk non parametrik (Kruskal-Wallis): Uji Mann-Whitney.
 - c) Uji korelasi Pearson : Bertujuan untuk menguji apakah terdapat korelasi yang signifikan antara pemberian ekstrak *Saccharomyces Cerevisae* terhadap kadar kreatinin serum pada mencit model penyakit gagal ginjal kronis

4. 9. Skema Alur Penelitian



Skema 4.1 Bagan alur kerja penelitian