

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 10 Maret 2015 – 21 Mei 2015 di Laboratorium Fisiologi Hewan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang. Pengukuran kadar BUN dan pembuatan preparat organ ginjal di Laboratorium Patologi Klinik dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : gelas ukur 500 mL dan 1000 mL, spatula, saringan, corong, nampan aluminium, kertas aluminium, bak plastik, timbangan *digital*, pengaduk kaca, labu *erlenmeyer*, oven, lemari pendingin, pH meter *digital*, *autoclave*, kandang tikus, tempat makan, botol minum, sonde lambung, papan bedah, masker, *gloves*, *dissecting set*, *disposable syringe*, *pot sample*, kertas label, pensil, *vacutainer tube red top 3 cc*, *icebox*, sentrifus, pipet tetes plastik, *microtube*, spektrofotometer, inkubator, *microtome*, *water bath*, *object glass*, *cover glass*, *hot plate*, dan mikroskop BX51.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah boraks, aquades, reagen kit *Borax Main Reagent* (BMR), sari kedelai, *grain* kefir kaukasia, gula, tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar* umur 8 – 12 minggu;

berat badan 170-200 g, sekam halus, pakan standar, Natrium klorida (NaCl) fisiologis 0,9 %, *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10%, alkohol 70%; 80%; 90%; 95%; 100%, xylol I, xylol II, xylol III, parafin cair, air, *Hematoxylin*, *Hydrochloricacid* (HCl) 0,6%, Litium karbonat 0,5%, *Eosin*, *Entellan/canada balsam*, larutan standar urea, reagen A (Natrium salisilat 62 mmol/L, Natrium nitroprusida 3,4 mmol/L, *buffer* fosfat 20 mmol/L pH 6,9, urease), reagen B (Natrium hipoklorit 7 mmol/L, Natrium hidroksida 150 mmol/L) dan standar primer (*glucose*, urea, kreatinin).

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan desain *post test only control group* menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pengambilan data dilakukan hanya pada saat akhir penelitian setelah dilakukannya perlakuan dengan membandingkan hasil pada kelompok yang diberi perlakuan dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan. Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana dan subjek dibagi menjadi 5 kelompok. Setiap kelompok hewan coba terdiri dari masing-masing 4 ekor hewan coba. Kelompok A adalah kontrol negatif, tikus hanya diberi pakan standar dan air minum. Kelompok B adalah kontrol positif, tikus diberi pakan yang mengandung boraks dengan konsentrasi 1,03%. Kelompok C adalah kelompok tikus yang diberi pakan yang mengandung 1,03% boraks dan kefir sari kedelai 5% dengan volume 1 mL/200gBB. Kelompok D adalah kelompok tikus yang diberi pakan yang mengandung 1,03% boraks dan kefir sari kedelai 5% dengan volume 2 mL/200gBB. Kelompok E adalah kelompok tikus yang diberi pakan yang

mengandung 1,03% boraks dan kefir sari kedelai 5% dengan volume 3 mL/200gBB. Kerangka operasional penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.

Tabel 4.1 Rancangan penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan			
Kadar Blood Urea Nitrogen dan Histopatologi Hepar	1	2	3	4
Kelompok A (kontrol negatif)				
Kelompok B (kontrol positif)				
Kelompok C (boraks + kefir 1 mL/200 gBB)				
Kelompok D (boraks + kefir 2 mL/200 gBB)				
Kelompok E (boraks + kefir 3 mL/200 gBB)				

4.4 Perhitungan Statistik

Menurut Kusrieningrum (2008), estimasi besaran sampel dapat dihitung berdasarkan rumus berikut;

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t : jumlah perlakuan

n : jumlah ulangan

Dari perhitungan diatas untuk penelitian yang memiliki perlakuan sebanyak lima macam diperoleh hasil, yaitu jumlah pengulangan sebanyak lebih dari atau sama dengan empat kali, sehingga jumlah minimal sampel penelitian yang digunakan sebanyak 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*).

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : pemberian boraks dan volume kefir sari kedelai

Variabel tergantung : kadar BUN dan gambaran histopatologi ginjal.

Variabel kontrol : tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar, jenis kelamin jantan, berat badan 170-200 g, umur 8-12 minggu, kandang, suhu lingkungan dan pakan.

4.6 Tahapan Penelitian

1. Persiapan hewan coba.
2. Pembuatan pakan yang ditambahkan boraks.
3. Pemberian pakan yang ditambahkan boraks.
4. Pembuatan kefir sari kedelai.
5. Pemberian kefir sari kedelai.
6. Pengambilan darah dan organ ginjal tikus.
7. Pembuatan preparat histopatologi ginjal.
8. Pengukuran kadar BUN.
9. Analisis data.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang berusia 8-12 minggu dengan berat antara 170-200 g selama satu minggu untuk adaptasi di tempat pemeliharaan dalam menyeragamkan cara hidup dan makanannya sebelum dilakukan percobaan. Tikus ditempatkan dalam kandang plastik dengan tutup terbuat dari kawat ram dan dialasi sekam serta diberi sekat pembatas. Tikus diletakkan dalam kandang bersekat untuk memudahkan pengontrolan pemberian pakan. Selama aklimatisasi,

pakan dan air minum diberikan secara ad libitum. Lingkungan kandang dibuat agar tidak lembab, suhu kandang dijaga sekitar 25°C, dan ada pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam. Kesehatan tikus dipantau setiap hari dan berat badan tikus ditimbang sebelum dilakukan perlakuan. *Etical approval* dalam penggunaan hewan coba telah mendapat persetujuan dari Komisi Laik Etik Universitas Brawijaya Malang dengan No. 421-KEP-UB.

4.7.2 Pembuatan Pakan yang Ditambahkan Boraks

Pakan dibuat dengan mencampurkan 1 kg pakan standar dengan boraks sebanyak 10,3 g yang telah dilarutkan ke dalam 1000 mL aquades. Pelarut aquades diperlukan untuk memudahkan boraks meresap ke dalam pakan sehingga diharapkan boraks tercampur secara merata.

Perhitungan pembuatan pakan yang mengandung boraks dengan konsentrasi 1,03% adalah sebagai berikut : (1,03% boraks = 10300 ppm boraks = $\frac{10300 \text{ mg boraks}}{1 \text{ kg pakan}} = \frac{10,3 \text{ g boraks}}{1 \text{ kg pakan}}$), maka dibutuhkan 10,3 g boraks yang dilarutkan dalam 1000 mL aquades kemudian dicampurkan ke dalam 1 kg pakan. Setelah pencampuran cukup merata, pakan kemudian dibentuk dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 120°C selama 5 jam. Setelah kering dilakukan pengecekan kandungan boraks di dalam pakan dengan menggunakan kit *Borax Main Reagent* (BMR). Prosedur pembuatan pakan yang ditambahkan boraks dapat dilihat pada lampiran 3.

4.7.3 Pemberian Pakan yang Ditambahkan Boraks

Pemberian pakan yang mengandung boraks dengan konsentrasi 1,03% sebanyak 10 g/ekor/hari diberikan selama 21 hari. Konsentrasi boraks

yang digunakan didasarkan pada hasil penelitian Weir and Fisher dalam Krieger (2001) yang menyatakan bahwa paparan boraks pada pakan tikus *Sprague dawley* dengan konsentrasi 10300 ppm atau sama dengan 1,03% boraks menimbulkan efek toksik secara sistemik dan menimbulkan atropi pada testis. Selain itu juga teramati gejala seperti sesak nafas, bengkak pada kaki dan inflamasi pada mata tikus. Keberadaan boraks dalam dosis toksik pada makanan dapat mengakibatkan kerusakan pada organ ginjal seperti pelebaran kapsula Bowman dan kerusakan tubulus proksimal (Nair, *et al.*, 2012).

4.7.4 Pembuatan Kefir Sari Kedelai

Pembuatan sari kedelai oleh industri rumah tangga risa, yaitu dalam 1000 mL sari kedelai yang dihasilkan, membutuhkan 8 kg kacang kedelai dan ditambahkan 50 g gula. Kefir sari kedelai dibuat dengan konsentrasi 5% berdasarkan penelitian Liu *et al.* (2005). Pembuatan kefir sari kedelai 5% dimulai dengan mencampurkan 1000 mL sari kedelai dan 50 g *grain* kefir lalu diaduk perlahan hingga tercampur rata. Setelah selesai, bahan disimpan selama 24 jam pada suhu ruang. Pada saat 12 jam setelah pencampuran dilakukan pengadukan secukupnya. Kefir yang mengandung gas dan alkohol dapat dihasilkan dengan menyimpannya di dalam wadah yang ditutup rapat (kedap udara). Kemudian *grain* kefir disaring dan dipisahkan dari kefir yang baru jadi. Kefir dapat langsung dikonsumsi atau ditutup wadah kefir dan disimpan lagi selama 12–24 jam sebelum dikonsumsi. Kefir dapat bertahan

hingga sebulan lebih di lemari pendingin, tetapi jika dibiarkan di suhu ruang, kefir hanya bertahan dua hari (Widodo, 2002).

4.7.5 Pemberian Kefir Sari Kedelai

Kefir sari kedelai 5% diberikan dengan sonde lambung selama 21 hari berturut-turut. Volume kefir sari kedelai pada kelompok C, D, dan E adalah 1 mL/200g BB, 2 mL/200g BB, dan 3 mL/200g BB. Penentuan volume berdasarkan volume maksimal pemberian obat dalam bentuk cairan pada hewan coba tikus (Hrapkiewicz, *et al.*, 2013; Liu, *et al.*, 2005). Perhitungan volume pemberian kefir sari kedelai dapat dilihat pada lampiran 4.

4.7.6 Pengambilan Darah dan Organ Ginjal Tikus

Pengambilan darah dan ginjal tikus dengan cara eutanasi dengan melakukan dislokasi pada leher. Tikus diletakkan pada papan bedah dengan posisi rebah dorsal. Sebelum pembedahan, kaki dan mulut tikus difiksasi menggunakan jarum. Pembedahan dimulai melalui abdominal hingga terlihat semua organ dalam. Jantung terletak diatas rongga dada sebelah kiri, diatas diafragma. Sampel darah dikoleksi dari jantung tikus menggunakan spuit 3 cc, dimasukkan ke dalam *vacutainer tube red top* 3 cc dan didiamkan dalam kondisi kemiringan 30-45° selama 15-20 menit. Setelah itu disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Darah akan membeku dan terpisah menjadi bagian serum (berwarna kuning jernih di bagian atas) dan koagulan (berwarna merah di bagian bawah). Serum diambil dengan menggunakan pipet tetes plastik dan dimasukkan ke dalam *microtube*.

Ginjal yang terletak pada retroperitoneal dikeluarkan kemudian dibilas

menggunakan Natrium klorida (NaCl) 0,9% untuk menghilangkan darah dan kotoran yang masih tersisa. Ginjal disimpan di dalam *pot sample* berisi larutan *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% untuk mencegah kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, dan mengawetkan komponen histologi.

4.7.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal

Pembuatan preparat histopatologi diawali dengan fiksasi jaringan ginjal ke dalam larutan BNF 10%. Jaringan yang sudah mengalami fiksasi dilakukan proses dehidrasi dalam alkohol dengan konsentrasi bertingkat (alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, 100%). Langkah selanjutnya adalah proses *clearing* yaitu penjernihan jaringan dalam larutan xylol selama dua jam. Dilanjutkan dengan *embedding* yaitu penanaman jaringan ke dalam parafin cair. Jaringan yang berada di dalam blok parafin yang telah membeku kemudian dipotong dengan ketebalan 5-6 μm . Potongan jaringan diletakkan di atas air hangat, lalu diangkat dan diletakkan di atas gelas objek. Potongan jaringan dan gelas objek dikeringkan dalam inkubator dengan suhu 60°C selama 24 jam. Sediaan yang telah melekat sempurna pada gelas objek kemudian siap diwarnai dengan teknik pewarnaan HE.

Pewarnaan HE dilakukan dengan tahapan deparafinasi, dimana preparat dimasukkan dalam xylol bertingkat 1-3 masing-masing selama 5 menit. Berikutnya dilakukan tahapan rehidrasi preparat dimana preparat dimasukkan dalam alkohol bertingkat yang dimulai dari alkohol 100%, 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 5 menit. Preparat direndam

dalam akuades selama 5 menit. Tahapan pewarnaan dilakukan dengan preparat dimasukkan dalam pewarna *hematoxylin* hingga diperoleh hasil warna terbaik selama kurang lebih 10 menit. Preparat yang sudah diwarnai dengan *hematoxylin* dicuci dengan air mengalir selama 1 menit dan dimasukkan ke dalam HCl 0,6% selama 1 menit, dibilas dengan air mengalir selama 1 menit kemudian dimasukkan dalam Litium karbonat 0,5% selama 3 menit, dibilas dengan air mengalir 1 menit dan dimasukkan dalam pewarna *eosin* selama 5 menit. Preparat dibilas kembali dalam akuades untuk menghilangkan kelebihan *eosin*. Tahapan dehidrasi dilakukan dengan preparat dimasukkan dalam seri alkohol bertingkat dari 70%, 80%, 90%, 95%, 100%. Proses selanjutnya adalah *clearing* yaitu dengan memasukkan preparat pada xylol lalu dikeringkan. Setelah semua proses selesai, dilakukan *mounting* dengan menggunakan entellan (Susanto, 2014). Pengamatan preparat dilakukan secara menyeluruh di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x untuk mengamati perubahan pada glomerulus dan tubulus ginjal.

4.7.8 Pengukuran Kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN)

Kadar urea dalam darah ditentukan secara spektrofotometri dengan prinsip urea dihidrolisis menggunakan enzim urease menghasilkan amonia dan CO₂. Amonia yang terbentuk direaksikan dengan salisilat, natrium hipoklorit, dan natrium nitroprusida menghasilkan indofenol.

Pengamatan dan pengukuran kadar BUN dilakukan dengan menyiapkan sampel serum tikus, reagen A1 (natrium salisilat 62 mmol/L,

natrium nitroprusida 3,4 mmol/L, *buffer* fosfat 20 mmol/L pH 6,9), reagen A2 (urease), reagen B (natrium hipoklorit 7 mmol/L, natrium hidroksida 150 mmol/L), dan larutan standar urea.

Persiapan reagen dilakukan dengan memindahkan isi dari botol reagen A2 ke dalam botol reagen A1 dan dicampur hingga merata. Reagen B dan larutan standar sudah siap digunakan. Peralatan tambahan yang dibutuhkan yaitu *water bath* 37°C dan spektrofotometer.

Prosedur pengukuran dilakukan dengan menyiapkan tiga buah tabung reaksi. Tabung reaksi 1 berisi reagen A 1 mL, tabung reaksi 2 berisi 10 µL larutan standar dan 1 mL reagen A, tabung reaksi 3 berisi 10 µL sampel dan 1 mL reagen A. Dihomogenkan pada masing-masing tabung reaksi dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan masing-masing tabung reaksi dengan reagen B sebanyak 1 mL, dihomogenkan kembali dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Setelah itu dipindahkan larutan dari tabung reaksi ke dalam kuvet dan dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer. Pengukuran absorbansi standar dan sampel menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm selama dua menit (Biosystems, 2013).

4.7.9 Analisis Statistik

Data penelitian berupa pengukuran kadar BUN dengan metode spektrofotometri menggunakan alat spektrofotometer. Selanjutnya, dilakukan analisa kuantitatif dengan dianalisis menggunakan statistika dengan pola ragam RAL dalam *Analysis of Varians* (ANOVA).

Kemudian untuk mengetahui apakah ada perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau *Tukey Test* dengan tingkat signifikansi $\alpha=5\%$ menggunakan *Microsoft Office Excel* dan *Statistical Package for The Social Science (SPSS) version 16.0 for windows*. Sementara itu, hasil pengamatan histopatologi glomerulus dan tubulus ginjal dianalisa kualitatif secara deskriptif.

