

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2016 s/d bulan Maret 2017 di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Optik Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, dan Laboratorium Biofisika Jurusan Fisika Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

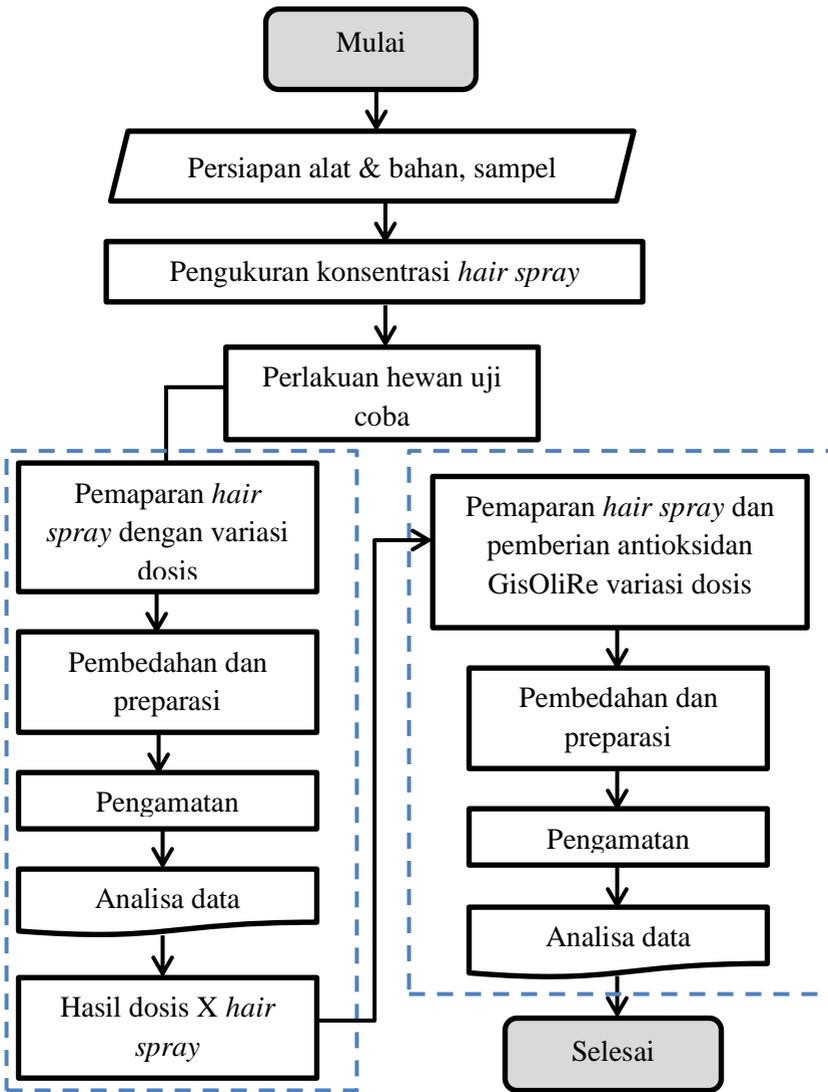
Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu *hair spray*, mencit jantan (2-3 bulan) sebanyak 55 ekor, antioksidan ekstrak GisOliRe (kulit buah manggis, brokoli, dan pare), air mineral, aquades 1000 ml, formalin 10%, sekam kayu dan pakan mencit, PBS 1000 ml, xylol, alkohol, pewarna giemsa, aluminium foil, dan NaCl 0.9%.

3.2.2 Alat penelitian

Alat yang akan digunakan di penelitian ini yaitu timbangan digital, *closed chamber*, mikroskop, *obyek glass*, alat bedah, suntik, alat preparasi (masker dan sarung tangan), kandang, gelas beaker, *stopwatch*, pipet, pengaduk, dan cawan petri.

3.3 Prosedur Penelitian

Berikut ini adalah prosedur penelitian dari tahap 1 hingga tahap 2 yang dapat disajikan seperti pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram alir penelitian.

3.3.1 Persiapan sampel

Tabel 3.1 Pengelompokan mencit berdasarkan perlakuan

Kelompok	Perlakuan		
	Pemaparan <i>hair spray</i>	Pemberian antioksidan ekstrak GisOliRe	Dosis X <i>hair spray</i>
G-	-	-	-
G+	√	-	-
GA-	-	-	√
GA+	-	√	√

Pada penelitian tahap 1, mencit yang berjumlah 30 ekor dibagi menjadi 6 kelompok. Dalam 1 kelompok terdapat 5 ekor mencit. Kemudian, dilakukan aklimatisasi terlebih dahulu dengan lingkungan selama 1 minggu. Selama 1 minggu tersebut, mencit diberi pakan berupa pelet, air mineral, dan pembersihan kandang. Setelah dilakukan aklimatisasi, selanjutnya pemaparan *hair spray* dapat dilakukan. Waktu yang diperlukan agar semua partikel yang berada didalam *closed chamber* terhirup oleh mencit yaitu 20 menit. Setelah dipapari oleh *hair spray*, mencit tersebut dikembalikan ke kandang. Penelitian tahap 1 dan tahap 2 ini berlangsung selama 14 hari. Perlu diketahui bahwa pada penelitian tahap 1, dosis semprot yang digunakan yaitu 2x, 4x, 6x, 8x, 10x. Pada kehidupan sehari-hari banyaknya semprotan *hair spray* yang digunakan pada rambut yaitu 2x semprot, sedangkan untuk 10x penyemprotan *hair spray* pada rambut tersebut biasanya digunakan saat adanya acara khusus seperti acara pernikahan.

Penelitian tahap 2 dapat dilakukan apabila telah diperoleh data X dosis dari penelitian tahap 1. Pada penelitian tahap 2, jumlah mencit yang digunakan yaitu 25 ekor, kemudian dalam 1 kelompok terdapat 5 mencit dengan varian antioksidan ekstrak GisOliRe.

Sehingga terdapat 5 kelompok dalam penelitian tahap 2 ini. Aklimisasinya pun juga dilakukan selama 7 hari, akan tetapi pada 3 hari terakhir mencit-mencit tersebut diberi antioksidan ekstrak GisOliRe berdasarkan dosis yang telah ditentukan pada masing-masing kelompok. Kemudian pada hari ke 8, terlebih dahulu mencit diberi antioksidan ekstrak GisOliRe, kemudian mencit diistirahatkan selama 5 menit sebelum dilakukan pemaparan *hair spray*. Setelah proses tersebut, mencit yang telah diistirahatkan dapat dipapari oleh *hair spray* selama 20 menit. Dosis pemaparan yang digunakan adalah dosis X yang telah diperoleh dari penelitian tahap 1. Sehingga dapat disimpulkan bahwa, pada penelitian tahap 1 merupakan uji toksitas dalam merusak sel ginjal pada mencit jantan.

Berikut ini adalah tabel pengelompokan mencit berdasarkan dosis pemaparan dan berdasarkan varian dosis antioksidan GisOliRe yang berkorelasi dengan X dosis efektif dari *hair spray* :

Tabel 3.2 Pengelompokan mencit berdasarkan dosis yang diberikan

Kelompok		Keterangan
G0	Kontrol negatif	Tanpa paparan <i>hair spray</i>
G1	Kontrol positif	Paparan <i>hair spray</i> 2x semprot
G2		Paparan <i>hair spray</i> 4x semprot
G3		Paparan <i>hair spray</i> 6x semprot
G4		Paparan <i>hair spray</i> 8x semprot
G5		Paparan <i>hair spray</i> 10x semprot

GA0	Kontrol negatif	Paparan <i>hair spray</i> dengan X dosis semprot dan tanpa antioksidan ekstrak GisOliRe
GA1	Kontrol positif	Paparan <i>hair spray</i> dengan X dosis semprot dan pemberian antioksidan ekstrak GisOliRe 4,475 ml/ 1 mg aquades (dosis I)
GA2		Paparan <i>hair spray</i> dengan X dosis semprot dan pemberian antioksidan ekstrak GisOliRe 5,975 ml/ 1 mg aquades (dosis II)
GA3		Paparan <i>hair spray</i> dengan X dosis semprot dan pemberian antioksidan ekstrak GisOliRe 7,475 ml/ 1 mg aquades (dosis III)
GA4		Paparan <i>hair spray</i> dengan X dosis semprot dan pemberian antioksidan ekstrak GisOliRe 8,975 ml/ 1 mg aquades (dosis IV)
GA5		Paparan <i>hair spray</i> dengan X dosis semprot dan pemberian antioksidan ekstrak GisOliRe 10,475 ml/ 1 mg aquades (dosis v)

3.3.2 Penentuan dosis antioksidan ekstrak GisOliRe

Antioksidan yang digunakan pada penelitian ini yaitu GisOliRe. GisOliRe merupakan singkatan dari kulit buah manggis, brokoli, dan pare. Antioksidan yang akan digunakan telah dalam bentuk ekstrak dan dapat dikonsumsi oleh manusia.

$$\text{Dosis mencit} = \frac{\text{massa mencit}}{\text{massa manusia}} \times \text{dosis manusia} \quad (3.1)$$

Tabel 3.3 Proporsi dosis antioksidan untuk manusia/hari

No.	Jenis antioksidan (ekstrak)	Dosis/hari	Hasil (mg/hari)
1	Kulit buah manggis (@550 mg)	2	1100
2	Brokoli (@675 mg)	1	675
3	Pare (@550 mg)	2	1100

Sehingga, dalam menentukan antioksidan yang akan digunakan dapat dilakukan dengan cara perbandingan yaitu 1:1:1. Setelah itu, dosis yang digunakan pada manusia dengan berat badan rata-rata yaitu 70 kg, akan dikoversikan ke dosis mencit dengan berat badan rata-rata mencit yaitu 20 gram. Sehingga nilai konversi yang dihasilkan dari dosis manusia ke dosis mencit yaitu 0,0026. Untuk mengetahui konversi dosis manusia ke dosis mencit ataupun sebaliknya, dapat dilihat pada Tabel 3.5.

Jumlah dosis antioksidan yang digunakan dalam sehari dengan varian dosis dapat dilihat pada Tabel 3.2. Setelah dilakukan perhitungan antioksidan, kemudian antioksidan tersebut ditimbang memakai timbangan digital. Setelah dibuat beberapa varian dosis antioksidan, maka antioksidan dilarutkan ke dalam 5 ml larutan aquades. Dalam pemberian antioksidan, dilakukan dengan cara per oral, yaitu tiap 1 ml antioksidan berlaku untuk 1 mencit. Untuk mengetahui cara pemberian maksimum antioksidan terhadap hewan

coba, dapat dilihat pada Tabel 3.6. Hal ini juga berlaku pada mencit yang lain dengan kelompok yang berbeda. Dosis yang telah ditetapkan seperti pada Tabel 3.2 merupakan dosis yang berlaku hanya sehari, sehingga untuk hari berikutnya antioksidan ditimbang lagi berdasarkan dosis yang dibutuhkan.

Tabel 3.4 Dosis antioksidan untuk setiap mencit dalam sehari yang telah dikonversi dari dosis manusia.

No.	Jenis antioksidan (ekstrak)	Dosis manusia (mg/hari)	Dosis mencit (mg/hari)
1	Kulit buah manggis	1100	2,860
2	Brokoli	675	1,755
3	Pare	1100	2,860

Tabel 3.5 Konversi dosis dari berbagai hewan coba ke dosis manusia (Akhila, Shyamjith, Deepa, & Alwar, 2007)

Diketahui / Dicari	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 1,5 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,23	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmut 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 1,5 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,43	0,1	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,1	0,22	1,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Tabel 3.6 Total konsentrasi obat yang diberikan pada hewan coba menurut R. Laurence & A.L Bacharach. 1981. *Evolution of Drug Activities: Pharmametrics.*

Jenis Hewan dan Berat Badan (BB)	Cara Pemberian dan Volume Maksimum dalam mililiter				
	i.v	i.m	i.p	s.c	p.o
Mencit (20 – 30 g)	0.5	0.05	1.0	0.5 – 1.0	1.0
Tikus (100 g)	1.0	0.1	2.0 – 5.0	2.0 – 5.0	5.0
Hamster (50 g)	-	0.1	1.0 – 5.0	2.5	2.5
Marmut (250 g)	-	0.25	2.0 – 5.0	5.0	10.0
Merpati (300 g)	2.0	0.5	2.0	2.0	10.0
Kelinci (2,5 Kg)	5.0 – 10.0	0.5	10.0 - 20.0	5.0 – 10.0	20.0
Kucing (3 Kg)	5.0 – 10.0	1.0	10.0 - 20.0	5.0 – 10.0	50.0
Anjing (5 Kg)	10.0 – 20.0	5.0	20.0 – 50.0	10.0	100.0

Keterangan :

- i.v = Intravena
- i.m = Intramuscular
- i.p = Intraperitoneal
- s.c = Sub Cutan
- p.o = Per oral

3.4 Perhitungan Kerusakan Pada Sel Ginjal

Aplikasi OptiLab digunakan untuk mengamati sel, dimana komputer yang digunakan terhubung dengan mikroskop binokuler. Pada OptiLab, dapat dilakukan pengambilan gambar sel sesuai yang di inginkan. Setelah itu, tekan foto pada *menu bar*, kemudian di simpan sesuai nama preparat yang diamati. Untuk menghitung banyaknya jumlah sel yang rusak dan sel yang sehat pada sel

glomerulus dan sel tubulus dapat menggunakan aplikasi *Image Ruster*. Dalam menggunakan *Image Ruster*, terlebih dahulu harus mengetahui bentuk sel sehat dan bentuk sel yang mengalami kerusakan. Cara menentukan banyaknya sel rusak dan sel yang normal, dapat dilihat pada *menu counter*. Untuk membedakan tanda sesuai bentuk dari sel yang diamati, dapat menggunakan *marker type*. Sebelum menghitung sel, terlebih dahulu membuat judul sel sesuai kerusakan yang akan diamati. Kemudian, sel tubulus yang telah ditandai sesuai kerusakannya, akan muncul pada *menu count*. Hal ini berlaku pada sel tubulus, sedangkan untuk sel glomerulus yaitu, jika terdapat ruang bowman maka jarak tersebut diukur menjadi 8 sisi menggunakan *measure bar*. Garis yang telah ditarik dari ujung sel glomerulus menuju kapsul bowman, akan muncul secara otomatis pada bagian *text bar*. Jika tidak terdapat ruang, maka jaraknya dapat dianggap 0.

Gambar sel mencit dapat diamati dengan menggunakan mikroskop komputer binokuler *olympus Cx 31*, dengan perbesaran 400x. Mikroskop komputer binokuler *olympus* dapat digunakan untuk mengamati adanya perbedaan antara sel sehat dengan sel yang mengalami kerusakan pada sel glomerulus maupun pada sel tubulus. Dalam melakukan pengamatan untuk sel-sel dari ginjal, dapat menggunakan aplikasi *OptiLab* dan aplikasi *Image Ruster*. Cara yang dilakukan untuk mengetahui kerusakan yang akan dihasilkan dari sel ginjal mencit yaitu dengan cara menghitung persentase kerusakan pada glomerulus dan tubulus ginjal. Cara mengetahui adanya kerusakan pada glomerulus dapat dilakukan dengan mengukur ruang yang dihasilkan antara kapsul *bowman* dan sel glomerulus, dengan memerhatikan tingkat kerusakan yang dihasilkan, seperti adanya pelebaran ruang bowman dengan kriteria jarak seperti pada Tabel 3.7.

Pada satu preparat, terdapat satu organ ginjal mencit yang telah dipotong dengan ketebalan satuan mikro. Dalam satu mencit terdapat 5 lapang pandang hasil sayatan organ ginjal. Setelah itu,

dirata-ratakan sehingga diperoleh persentase kerusakan untuk satu mencit. Dalam satu kelompok terdapat 5 mencit, sehingga total gambar mikroskopik yaitu 150 gambar sel organ ginjal untuk tahap 1. Sedangkan pada tahap 2 gambar mikroskopik yang dihasilkan yaitu 125 gambar. Maka total gambar yang diamati yaitu 275 gambar. Pada setiap gambart terdapat satu sel glomerulus dan terdapat sel tubulus. Untuk menghitung persentase kerusakan pada sel glomerulus dan sel tubulus dapat menggunakan *microsoft excel*.

Tabel 3.7 Persentase kerusakan yang dihasilkan pada sel glomerulus

Sel glomerulus	Jarak (µm)	Kerusakan (%)	Keterangan
	≤ 6	0	Normal
	6 - ≤ 12	20	Tidak
	> 12 - ≤ 18	40	Tidak
	> 18 - ≤ 24	60	Tidak
	> 24 - ≤ 30	80	Tidak
	> 30	100	Tidak

Glomerulus dapat dikatakan normal apabila terdapat jarak antara glomerulus dengan kapsul bowman yaitu ≤ 6 µm. Dalam menghitung kerusakan sel glomerulus dapat menggunakan persamaan berikut :

$$\% \text{ Kerusakan glomerulus} = \frac{\Sigma \text{glomerulus yang rusak}}{\Sigma \text{glomerulus yang teramati}} \times 100\%$$

Sedangkan, untuk mengetahui kerusakan yang terdapat pada tubulus, dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut ini dengan cara memperhatikan adanya pelebaran serta penyempitan pada sel tersebut.

$$\% \text{ Kerusakan tubulus} = \frac{\Sigma \text{tubulus yang menyempit}}{\Sigma \text{tubulus yang teramati}} \times 100\%$$

Sehingga untuk mengetahui persentase kerusakan rata-rata pada sel organ ginjal yaitu :

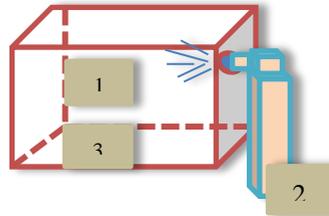
$$\% \text{sel ginjal rusak} = \frac{\% \text{kerusakan tubulus} + \% \text{kerusakan glomerulus}}{2}$$

3.5 Rangkaian Alat

Rangkaian alat untuk penelitian ini yaitu menggunakan *closed chamber*. *closed chamber* berfungsi sebagai ruang yang digunakan mencit untuk menghirup partikel yang berasal dari *hair spray*. Pada *closed chamber* tersebut diberi lubang kecil sebagai tempat masuknya partikel-partikel yang berasal dari *hair spray*.

Keterangan :

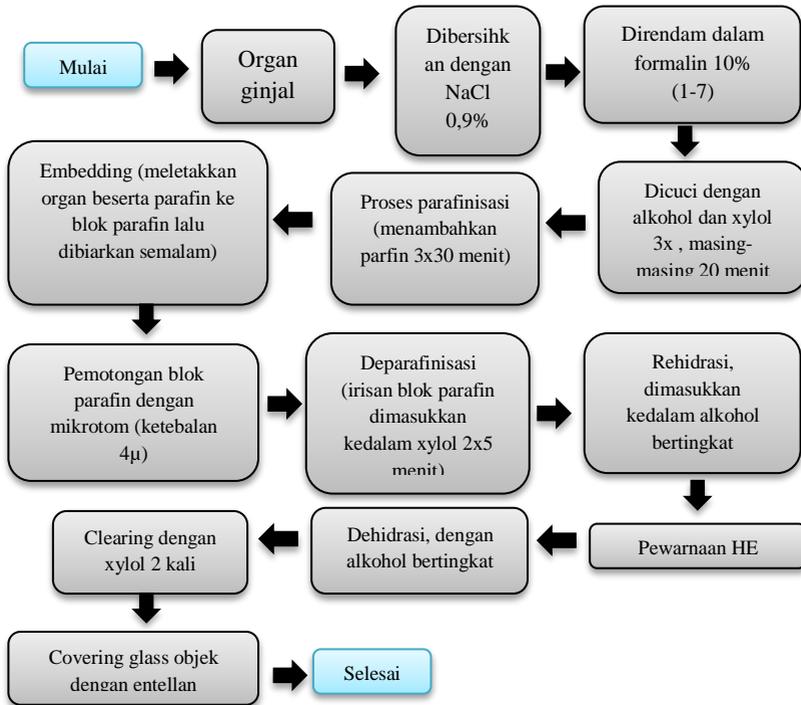
1. *closed chamber*
2. *Hair spray*
3. Sampel (mencit)



Gambar 3.2 Rangkaian alat penelitian.

3.5 Diagram Alir Pembuatan Preparat

Berikut ini adalah diagram alir dalam pembuatan preparat yang kemudian akan diamati untuk diperoleh suatu data.



Gambar 3.3 Tahapan pembuatan preparat