

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental laboratory* dengan metode *Randomized Posttest Only Controlled Group Design* untuk mengetahui peran ketela rambat dalam menurunkan progresifitas kerusakan ginjal pada hewan model lupus nefritis yang diinduksi pristan.

4.2 Populasi dan Sampel

Subjek penelitian ini adalah mencit putih betina jenis BALB/c berusia 8 minggu dalam kondisi sehat yang dibuktikan dengan sertifikat bebas penyakit.

a) Besaran Sampel

Jumlah mencit yang dibutuhkan dihitung dengan rumus (Indra, 1999) :

$$p(n-1) > 15$$

Dimana: n = jumlah sampel tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan (p) = 5, yaitu 1 kelompok kontrol negative, 1 kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan sehingga didapat nilai n sebagai berikut:

$$5(n-1) > 15$$

$$n-1 > 3$$

$$n > 4$$

Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan adalah 5 ekor mencit sehingga jumlah total mencit yang dibutuhkan sejumlah 25 mencit. Namun untuk mengurangi terjadinya *lose of sample* di tengah-tengah penelitian

karena mencit mati, maka jumlah sampel ditambah 1 ekor mencit tiap perlakuan, total mencit yang digunakan yaitu 30 ekor.

b) Kelompok Perlakuan

Mencit BALB/c dibagi menjadi 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok kontrol positif, dan 2 kelompok perlakuan, yang masing-masing terdiri dari 6 ekor mencit dengan pembagian secara acak. Adapun pembagian kelompok mencit tersebut sebagai berikut :

1. Kelompok kontrol negatif (A) adalah kelompok mencit tanpa intervensi
2. Kelompok kontrol positif (B) adalah kelompok mencit yang diberi pristan tanpa ekstrak ketela rambat
3. Kelompok perlakuan satu (C) adalah kelompok mencit yang diberi pristan dan ekstrak ketela rambat 175mg/KgBB/hari
4. Kelompok perlakuan dua (D) adalah kelompok mencit yang diberi pristan dan ekstrak ketela rambat 350mg/KgBB/hari
5. Kelompok perlakuan dua (E) adalah kelompok mencit yang diberi pristan dan ekstrak ketela rambat 700mg/KgBB/hari (Wang *et al*, 2010).

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pristan dengan volume 0,5ml dan ekstrak ketela rambat dengan dosis 175mg/KgBB/hari, 350mg/KgBB/hari, dan 700mg/kgBB/hari (Wang *et al*, 2010); variabel terikat adalah gambaran histopatologi dari lapisan mukosa ginjal, jumlah intersisial sel radang kronis dan jumlah sel tubular ginjal.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Histologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan alokasi waktu 5 bulan.

4.5 Instrumen Penelitian

a) Bahan Penelitian

Ketela rambat, pakan mencit, ethanol 95%, alkohol absolut, alkohol 96%, alkohol asam, formalin, parafin, *gliserin egg albumin*, sabun antiseptik, dan PBS.

b) Alat Penelitian

Kandang mencit, botol minum, alat semprot, tempat makan, pisau, blender, neraca analitik, kertas saring, *beaker glass* 500ml, *rotatory evaporator vacuum*, timbangan OHAUS, mortar, gelas ukur, pengaduk, sonde lambung mencit, timbangan digital, pisau bedah, papan bedah, pinset, *object glass*, mikrotom, *heater*, kamera digital, tempat cuci tangan, sarung tangan, spuit 0,5 ml, spuit 10 ml, sentrifuge, vortex, pipet mikro, tap (biru, kuning, dan putih), tabung falcon, dan endorf.

4.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak ketela rambat diperoleh dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 95% yang dilanjutkan dengan evaporasi. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB
2. Ginjal mencit dibuat preparat dengan metode blok parafin dan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE). Kemudian dipotong setebal 6 μ m dan diamati bentuknya dibawah mikroskop cahaya di laboratorium Parasitologi FKUB.
3. Klasifikasi *staging* Nefritis Lupus sesuai dengan kriteria WHO (2004)

Klasifikasi Staging Nefritis Lupus (WHO, 2004)

Kelas	Gambaran patologi anatomi
I	Glomeruli normal. Perubahan mesangial minimal.
II	Mesangial proliferasif NL. Perubahan mesangial diffuse dan hiperseluler.
III	Fokal segmental proliferasif NL. Perubahan mesangial diffuse dengan hiperseluler dan atau deposit epimembranous segmental.
IV	Diffuse NL (mesangial/mesangiocapillary berat dengan deposit subendotelial yang nyata. Deposit mesangial selalu ada, dan seringkali deposit subepitelial).
V	Membranous NL. Hiperseluler mesangial ringan. Deposit epimembranous.
VI	Sklerosing NL tahap lanjut.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Penyiapan Hewan Coba

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan *comfeed*, alcohol 70%, hewan uji mencit galur Balb/C, dan seleksi mencit (umur dan jenis kelamin). Mencit diadaptasikan di dalam laboratorium parasitologi selama tujuh hari.

4.7.2 Ekstraksi Umbi Ketela Rambat

Umbi ketela rambat (*Ipomoea batatas*) dihaluskan menggunakan blender dan ditimbang 100 gr menggunakan timbangan analitik. Kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambah dengan pelarut etanol 95 % kemudian direndam (maserasi) selama 3 hari. Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30°-40° terhadap meja, kemudian 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 pasta (Wang *et al.*, 2010).

4.7.3 Pemberian Pristan

Pristan dalam volume 0,5ml diinjeksikan secara intraperitoneal pada kelompok mencit B, C, D, dan E sebanyak satu kali selama penelitian (5 bulan) (Sato *et al.*, 1995)

4.7.4 Pemberian Ekstrak Ketela Rambat (*Ipomoea batatas*)

Ekstrak ketela rambat dalam dosis 175mg/kgBB/hari, 350 mg/kgBB/hari, dan 700mg/kgBB/hari diberikan pada kelompok mencit C, D, dan E setelah melewati masa 3 bulan pasca injeksi pristan secara intraperitoneal dan diberikan selama 4 minggu secara oral menggunakan sonde (Wang *et al.*, 2010)

4.7.5 Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal

Ginjal diambil melalui pembedahan kemudian difiksasi dengan merendam ginjal mencit 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 0,5 jam, dan xylol PA selama 2x30 menit. Jaringan dipotong setipis mungkin dan dimasukkan ke dalam *melted* paraffin : xylene = 1:1 selama 1 jam dan paraffin selama 2x1 jam. Kemudian

dipotong dengan ketebalan 6 μ m. Hasil pemotongan diletakkan di gelas objek dilapisi dengan putih telur dan *gliserol*, dengan perbandingan, 1:1. 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, dan dikeringkan (Fan *et al*, 2012).

4.7.6 Proses Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak khusus dan dicelupkan secara berurutan ke dalam larutan xylol (3 menit), etanol absolute (3 menit), etanol 90% (3 menit), etanol 80% (3 menit), bilas dengan air keran selama 1 menit, larutan hematoksilin (6-7 menit), bilas dengan air keran selama 1 menit, larutan pembiru (1 menit), air keran (1 menit), larutan eosin (1-5 menit), bilas dengan air keran selama 1 menit. (Lab Patologi Anatomi FKUB, 2013).

4.7.7 Pengumpulan Data

Pembuatan preparat pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya secara histologi dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin. Pengamatan preparat menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran objektif 40 X. Pengamatan dilakukan pada 20 lapang pandang tiap preparat (Fitri dkk, 2013). Setiap data yang diperoleh dicatat (dalam tabel). Untuk menghindari pengulangan pengamatan dilakukan dari pojok bawah kiri digeser ke kanan kemudian dilakukan sedikit pergeseran ke atas.

4.7.8 Analisis Data

Data yang diharapkan adalah gambaran morfologi ginjal dan jumlah sel radang. Pengamatan gambaran morfologi ginjal dan jumlah sel radang dilakukan dengan bantuan mikroskop cahaya. Kemudian jumlah sel radang dianalisa menggunakan program SPSS 17.0 for Windows dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Yang dilakukan pertama adalah Uji Asumsi Data, Uji Normalitas dan Homogenitas Data. Jika sebaran data normal dan varian data homogen, maka dilanjutkan dengan uji hipotesis komparatif dan korelatif Parametrik, uji *One-way ANOVA*, *Post Hoc test (uji Least Significant Difference)* dan uji korelasi *Pearson*. Jika sebaran data tidak normal dan atau varian data tidak homogen, maka digunakan uji Non Parametrik, *Kruskal Wallis*, dan *Mann Whitney*.

