

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang telah dilakukan ialah jenis penelitian eksperimen. Yakni variabel yang hendak diteliti (variabel terikat) kehadirannya sengaja ditimbulkan dengan memanipulasi menggunakan perlakuan sesuai dengan kebutuhan (Nazir, 2003).

B. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL), dimana terdapat kelompok perlakuan dan kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003).

C. Variabel Penelitian

Terdapat beberapa variabel yang ada dalam penelitian ini, yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel kontrol. Berikut ialah penjabarannya:

1. Variabel Bebas

Dosis jus daun Jati Belanda dengan kadar 0,05 g/BB/hari, 0,10 g/BB/hari, 0,15 g/BB/hari, 0,20 g/BB/hari, dan 0,25 g/BB/hari.

2. Variabel Terikat

Berat dan histologi ginjal mencit yang meliputi diameter tubulus, lumen, serta ketebalan sel epitel.

3. Variabel Kontrol

Suhu ruangan berkisar antara 23 °C - 29 °C. Makanan yang diberikan berupa pakan tikus PC 551 sebanyak 5 gram/ekor mencit. Minum berupa air matang dengan cara *ad libitum*, sebanyak 5 ml/ekor mencit. Pencahayaan dilakukan selama 12 jam/hari dari pukul 06.00 WIB hingga 18.00 WIB.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Maret 2012 sampai dengan Juli 2012. Pembuatan jus daun Jati Belanda dilakukan di Laboratorium Fisiologi Universitas Pendidikan Indonesia. Pemeliharaan mencit dan pemberian jus daun Jati Belanda dilakukan di kandang hewan milik pribadi bertempat di daerah Kiaracondong, Bandung. Pembedahan dilakukan di Laboratorium Fisiologi Universitas Indonesia, sedangkan proses *mikroteknik* dilakukan di laboratorium Struktur Hewan Universitas Pendidikan Indonesia.

E. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh mencit (*Mus musculus L.*) galur *Swiss Webster* dan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan usia empat bulan.

Kelompok perlakuan, terdiri dari lima kelompok mencit yang masing-masing kelompok diberi jus daun Jati Belanda dengan dosis 0,05 g/BB/hari, 0,10 g/BB/hari, 0,15 g/BB/hari, 0,20 g/BB/hari, dan 0,25 g/BB/hari serta kelompok kontrol, terdiri dari kelompok mencit yang diberi jus daun Jati Belanda dengan dosis 0,00 g/BB/hari atau hanya diberi *aquades* setiap harinya.

Banyaknya pengulangan untuk setiap kelompok yang diberikan diperoleh dari rumus (Federer 1983 dalam Febriani, 2012: 31) yaitu:

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

$$\Leftrightarrow (6 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$\Leftrightarrow 5n - 5 \geq 15$$

$$\Leftrightarrow n \geq \frac{20}{5}$$

$$\Leftrightarrow n \geq 4$$

Keterangan: T = Jumlah perlakuan.

n = Jumlah pengulangan.

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah pengulangan untuk enam kelompok ialah sebanyak empat kali, sehingga jumlah total mencit sebanyak 24

Messa Andalusia, 2013

Pengaruh Jus Daun Jati Belanda (*Guazuma Ulmifolia Lamk.*) Terhadap Berat Dan Histologi Ginjal Mencit (*Mus Musculus L.*) Galur *Swiss Webster*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

ekor. Secara acak mencit-mencit tersebut dikelompokkan berdasarkan perlakuan yang diberikan, tujuan pengacakan adalah untuk menghilangkan bias (Sudjana, 2002).

Di bawah ini disajikan hasil pengacakannya:

Tabel 3.1. Hasil Pengacakan

| | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|
| D 6 | F 22 | C 9 | B 11 | D 1 | E 19 |
| E 21 | F 3 | A 24 | C 5 | A 16 | B 2 |
| B 15 | F 14 | E 12 | E 4 | B 20 | D 23 |
| F 7 | D 8 | A 10 | A13 | C 18 | C 17 |

Keterangan:

A : Diberi jus daun Jati Belanda dengan dosis 0,00 g/BB/hari.

B : Diberi jus daun Jati Belanda dengan dosis 0,05 g/BB/hari.

C : Diberi jus daun Jati Belanda dengan dosis 0,10 g/BB/hari.

D : Diberi jus daun Jati Belanda dengan dosis 0,15 g/BB/hari.

E : Diberi jus daun Jati Belanda dengan dosis 0,20 g/BB/hari.

F : Diberi jus daun Jati Belanda dengan dosis 0,25 g/BB/hari.

1,2,3 dst: Nomor mencit.

Berdasarkan Tabel 3.1. maka diperoleh peta kandang sebagai berikut:

Tabel. 3.2. Peta Kandang

| Kandang | Perlakuan (Dosis Daun Jati Belanda) | Nomor Mencit | | | |
|---------|--|--------------|----|----|----|
| | | 24 | 16 | 10 | 13 |
| A | 0,00 g/BB/hari | 24 | 16 | 10 | 13 |
| B | 0,05 g/BB/hari | 11 | 2 | 15 | 20 |
| C | 0,10 g/BB/hari | 9 | 5 | 18 | 17 |
| D | 0,15 g/BB/hari | 6 | 1 | 23 | 8 |
| E | 0,20 g/BB/hari | 19 | 21 | 12 | 4 |
| F | 0,25 g/BB/hari | 22 | 3 | 14 | 7 |

F. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan untuk memperoleh data dari berat dan histologi ginjal mencit dapat dilihat pada Tabel 3.3. dan Tabel 3.4. di bawah ini:

Tabel 3.3. Alat-alat Penelitian

| No. | Nama Alat | Jumlah | Spesifikasi |
|-----|------------------------------|--------|------------------|
| 1. | Bak bedah | 1 Buah | P = 29,5 cm |
| 2. | Timbangan <i>Dial-O-Gram</i> | 1 Buah | Merk OHAUS |
| 3. | <i>Tissue</i> | 1 Buah | Merk Nice |
| 4. | Gelas ukur 10 ml | 1 Buah | Merk Pyrex Iwaki |

Messa Andalusia, 2013

Pengaruh Jus Daun Jati Belanda (*Guazuma Ulmifolia Lamk.*) Terhadap Berat Dan Histologi Ginjal Mencit (*Mus Musculus L.*) Galur Swiss Webster

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

| 5. | Gelas ukur 1000 ml | 1 Buah | Merk Pyrex |
|-----|---|-----------|--|
| 6. | <i>Refrigerator</i> | 1 Buah | Merk National NR-B 43 AGR |
| No. | Nama Alat | Jumlah | Spesifikasi |
| 7. | <i>Beaker glass 250 ml</i> | 1 Buah | Merk Pyrex ® Iwaki TE-32 |
| 8. | Suntikan/alat <i>gavage</i> | 2 Buah | Merk Syring/981 |
| 9. | Pisau bedah | 2 Buah | Merk B BRAUN |
| 10. | <i>Beaker glass 100 ml</i> | 2 Buah | Merk Schott Duran |
| 11. | <i>Neubauer-Improved</i> | 2 Buah | <i>Neubauer-Improved</i> 0630010 LoT-No.3309 |
| 12. | Neraca timbangan analitik (<i>Electrical Balance</i>) | 2 Buah | Merk AND, HF 300 |
| 13. | Cawan Petri | 3 Buah | Merk Normax |
| 14. | Pipet | 4 Buah | Merk (Pyrex) Iwaki |
| 15. | Bak plastik (kandang) | 6 Buah | 40 cm x 30 cm x 12 cm |
| 16. | <i>Microscope Slides Ground Edges dan Deck Glass</i> | 20 Buah | 25,4 mm x 76,2 mm; 1 mm-1.2 mm <i>thick</i> dan 24 mm x 24 mm; 0.13 mm-0.17 mm |
| 17. | <i>Thermometer ruang</i> | 1 Buah | - |
| 18. | Lumpang dan alu | 1 Buah | - |
| 19. | Pinset | 1 Buah | - |
| 20. | Mikroskop cahaya | 2 Buah | - |
| 21. | Sarung tangan | 3 Buah | - |
| 22. | Lap | 3 Buah | - |
| 23. | Tempat minum | 6 Buah | - |
| 24. | Botol vial | 24 Buah | - |
| 25. | Cetakan paraffin | 24 Buah | - |
| 26. | Kertas label | 1 Pak | - |
| 27. | <i>Objek glass</i> | 2 Pak | - |
| 28. | <i>Cover glass</i> | 2 Pak | - |
| 29. | <i>Mikrotom</i> | 1 Unit | - |
| 30. | <i>Magnetic stirrer</i> | 1 Unit | - |
| 31. | <i>Hot plate</i> | 1 Unit | - |
| 32. | Kuas | 2 Unit | - |
| 33. | <i>Staining jar</i> | 5 Unit | - |
| 34. | Jarum pentul | 1 Bungkus | - |

Tabel 3.4. Bahan-bahan Penelitian

| No. | Nama Bahan | Jumlah |
|-----|-----------------------|---------|
| 1. | Mencit | 30 Ekor |
| 2. | Makanan mencit PC 551 | 20 Kg |

| 3. | <i>Parafin</i> lunak dan keras | 150 g |
|-----|---|----------|
| 4. | <i>Aquades</i> | 10 liter |
| 5. | Minyak <i>emersi</i> | 10 ml |
| 6. | <i>Entelan</i> | 50 ml |
| No. | Nama Bahan | Jumlah |
| 7. | <i>Eosin</i> | 100 ml |
| 8. | Jus daun Jati Belanda | 150 ml |
| 9. | <i>ERILICH's Haematoxylin</i> | 200 ml |
| 10. | <i>Eosin 2%</i> | 200 ml |
| 11. | <i>HAUPS</i> | 200 ml |
| 12. | <i>Toluol</i> | 200 ml |
| 13. | <i>Xylol</i> | 500 ml |
| 14. | NaCl 0,9% | 1000 ml |
| 15. | Alkohol 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% | 2400 ml |

G. Prosedur Penelitian

Prosedur yang dilakukan dalam penelitian ini, yaitu sebagai berikut:

1. Tahap Persiapan

a. Pembuatan Kandang dan Pemeliharaan

Kandang yang dijadikan tempat pemeliharaan terbuat dari bak plastik berukuran 40 cm x 30 cm x 12 cm. Bak plastik diberi medium tempat hidup berupa serutan kayu. Bagian atas bak diberi ram kawat untuk mencegah mencit keluar dari kandang. Setiap kandang diberi tempat minum sebanyak satu buah (Utami, 2011).

b. Pengumpulan Bahan dan Pembuatan Jus Daun Jati Belanda

Bubuk daun Jati Belanda dikumpulkan dari pemasok obat herbal cina di daerah Pasar Baru, Bandung. Kemudian dilakukan pembuatan jus daun Jati Belanda dengan cara *maserasi hidrolisis*. Yakni maserasi dengan menggunakan air sebagai pelarut bahan yang dibuat jus (ICSH, 2008).

Pembuatan stok jus daun Jati Belanda dilakukan dengan cara melarutkan satu bagian bubuk daun Jati Belanda ke dalam 10 bagian air. Kemudian didiamkan dalam wadah tertutup *aluminium foil* selama 24 jam pada suhu ruangan serta diberi *agitasi 60 rpm*. Setelah 24 jam, larutan disaring dan *residu*-nya diperas. Setelah itu jus daun Jati Belanda cair diuapkan pada suhu 70°C pada *waterbath*

hingga berubah menjadi pasta. Pasta kemudian disimpan dalam wadah tertutup dan dijadikan sebagai stok untuk dijadikan jus daun Jati Belanda (Indriani, 2006).

Untuk masing-masing dosis dilakukan pembuatan dengan cara di bawah ini:

1) 0,00 g/BB/hari

Aquades 10 ml tanpa penambahan jus daun Jati Belanda.

2) 0,05 g/BB/hari

0,05 gram jus daun Jati Belanda dilarutkan dalam *aquades* hingga 10 ml.

3) 0,10 g/BB/hari

0,10 gram jus daun Jati Belanda dilarutkan dalam *aquades* hingga 10 ml.

4) 0,15 g/BB/hari

0,15 gram jus daun Jati Belanda dilarutkan dalam *aquades* hingga 10 ml.

5) 0,20 g/BB/hari

0,20 gram jus daun Jati Belanda dilarutkan dalam *aquades* hingga 10 ml.

6) 0,25 g/BB/hari

0,25 gram jus daun Jati Belanda dilarutkan dalam *aquades* hingga 10 ml.

Penentuan dosis didasarkan pada penelitian Adjirni *et al.*, (2001) dan Rahardjo (2006). Dimana range 0,05 g/BB/hari hingga 0,25 g/BB/hari merupakan dosis aman penggunaan jus daun Jati Belanda. Sedangkan dosis *lethal* sendiri berjumlah 1,34 gram/BB/hari (Adjirni *et al.*, 2001; Utomo, 2008).

2. Tahap Perlakuan

a. Aklimatisasi Mencit

Sebelum diberi perlakuan, mencit di-*aklimatisasi* pada suhu ruangan rata-rata 23-29°C, periode ini dilaksanakan selama 7 hari dengan tujuan agar mencit bisa beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang akan ditempati selama percobaan. Mencit dikelompokkan dalam kandang berukuran 40 cm x 30 cm x 12 cm berdasarkan perlakuan yang diberikan dengan kepadatan empat ekor setiap kandang.

Selama *aklimatisasi*, semua kelompok diberi pakan sejumlah 5 g/ekor, dan minum secara *ad libitum*. Botol minuman dibersihkan tiap tiga hari sekali dan diisi ulang dengan air yang baru apabila air telah habis. Kandang dibersihkan

sebanyak seminggu sekali. *Aklimatisasi* dilakukan untuk meminimalkan faktor-faktor yang tidak diinginkan selama penelitian berlangsung.

b. Pemberian Jus Daun Jati Belanda

Pemberian jus daun Jati Belanda dilakukan selama 14 hari secara *gavage*, satu kali dalam sehari dilakukan setiap pagi. Tiap mencit dalam kelompok perlakuan diberi jus daun Jati Belanda sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Jus daun Jati Belanda yang diberikan adalah sebesar 0,25 ml/hari untuk masing-masing dosis. Hal ini bertujuan agar lambung mencit dapat menampung jus daun Jati Belanda selain pakan yang diberikan. Selama pemberian jus daun Jati Belanda, mencit diberi pakan standar sebanyak 5 g/ekor/hari dan minum secara *ad libitum*.

c. Pengambilan Ginjal

Mencit yang telah diberi perlakuan kemudian di-*dekapitasi*. ginjal kemudian dicuci dengan larutan *salin* 0,9%. Setelah dicuci, ginjal ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam botol yang berisi larutan formalin 5% untuk proses pengawetan.

d. Pembuatan Preparat

Pembuatan preparat dalam penelitian ini dilakukan dengan metode *parafin* dengan pewarnaan *Hematoxylin Erlich-Eosin*. Tahapan kerja dari metode *parafin* adalah sebagai berikut: *fiksasi, washing, dehidrasi, clearing, infiltrasi, embedding, sectioning, affixing, deparafinisasi, staining, mounting, dan labelling*.

Ginjal yang telah di-*fiksasi* dengan larutan formalin 5% kemudian dicuci dengan *aquades*. Tahap berikutnya adalah *dehidrasi* yang dilakukan dengan merendam dalam larutan alkohol bertingkat (konsentrasi 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, dan 100%) masing-masing larutan diganti sebanyak tiga kali setiap 30 menit, selama direndam ginjal selalu diputar/digoyangkan. Setelah *dehidrasi*, dilakukan tahap penjernihan dengan larutan *toluol* sampai tampak jernih selama 3 x 30 menit. Setelah tampak jernih, dapat memasuki tahap *infiltrasi parafin*. Tahap ini dilakukan di dalam oven yaitu dengan merendam dalam cairan *parafin* dengan titik leleh 48–52°C, 52–54°C, dan 54–56°C selama masing-

masing kurang lebih satu jam. Setelah di-*infiltrasi*, ditanam dalam *parafin* keras menggunakan cetakan logam hingga terbentuk blok *parafin* dengan ditengahnya. Tahap penyayatan dilakukan menggunakan *mikrotom* dengan ketebalan irisan 4µm. Irisan yang terbentuk ditempel pada gelas objek yang sebelumnya telah diolesi *haupt*. Agar benar-benar menempel, irisan kemudian ditetesi *aduades* lalu diletakkan di atas *hot plate* dengan suhu 40°C hingga mengering. Tahap selanjutnya adalah *deparafinisasi* yaitu menghilangkan *parafin* yang terdapat di dalam jaringan dengan cara merendam jaringan di dalam larutan *xilol* selama kurang lebih tiga detik. Setelah itu, jaringan memasuki tahap pewarnaan. Langkahnya yaitu mencelupkan jaringan ke dalam alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 30%, dan *aquades*.

Setelah itu, dilakukan pewarnaan dengan teknik yang diadaptasi dari Suntoro (1983). Jaringan kemudian dicelupkan ke dalam larutan pewarna *Hematoxylin Erlich* selama 3-7 detik lalu dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya, jaringan dicelupkan ke dalam alkohol 30%, 50%, 60%, dan 70%. Setelah itu, jaringan direndam dalam larutan pewarna yang kedua yaitu *Eosin Y* 0,5% dalam alkohol 70% selama 1-3 menit. Setelah terwarnai, jaringan dicelupkan kedalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan 100% lalu direndam dalam *xilol* selama lima menit. Tahap berikutnya adalah penutupan dengan cara meneteskan jaringan dengan *entelan* kemudian ditutup dengan kaca penutup. Terakhir, preparat diberi label dengan keterangan yang jelas. Dengan demikian jaringan siap diamati dan diambil gambarnya.

e. Pengukuran Berat Ginjal

Dilakukan dengan menggunakan timbangan neraca analitik, hasil pengukuran yang diambil merupakan hasil rata-rata dari tiga kali pengukuran.

f. Pengukuran Histologi Ginjal

Pengukuran histologi menggunakan mikroskop serta menggunakan *microfotometer* dengan skala 0,01 mm. Hasil pengukuran yang diambil merupakan hasil rata-rata dari lima kali pengukuran.

3. Tahap Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian terbagi menjadi dua bagian, yaitu data yang bersifat kualitatif dan data yang bersifat kuantitatif. Adapun analisis data yang dilakukan sebagai berikut:

a. Analisis Kuantitatif

Data yang telah diperoleh dianalisis secara statistik dengan program SPSS 16.0 *for windows* menggunakan taraf signifikansi sebesar 0,05, oleh karena itu kriteria penerimaan H_0 adalah jika nilai signifikansi lebih dari 0,05. Tahap awal yang dilakukan adalah uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Jika semua kelompok data berdistribusi normal maka dilanjutkan ke uji homogenitas menggunakan uji *Levene* untuk mengetahui perbedaan varians. Selanjutnya dilakukan uji *Anova One-Way* untuk mengetahui perbedaan rata-rata antar kelompok. Apabila terdapat perbedaan maka dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui perbedaan rata-rata tiap pasang kelompok menggunakan uji *Tukey* jika kelompok data tersebut homogen dan menggunakan uji *Games-Howell* jika kelompok data tersebut tidak homogen.

Jika minimal satu kelompok data tidak berdistribusi normal maka dilanjutkan ke uji *Kruskal-Wallis H* untuk mengetahui perbedaan rata-rata antar kelompok. Apabila terdapat perbedaan maka dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui perbedaan rata-rata tiap pasang kelompok. Uji *Mann-Whitney U* digunakan pada tiap pasang kelompok data yang memiliki minimal satu kelompok data yang tidak berdistribusi normal. Sedangkan untuk tiap pasang kelompok data yang berdistribusi normal digunakan uji *T equal variance assumed* jika pasangan kelompok data tersebut homogen dan digunakan uji *T equal variance not assumed* jika pasangan kelompok data tersebut tidak homogen.

Selanjutnya uji korelasi digunakan untuk melihat seberapa besar pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat menggunakan korelasi *Pearson* jika variabel bebas dan variabel terikat berskala interval dan berdistribusi normal, adapun jika salah satu variabel tidak berskala interval dan tidak berdistribusi normal digunakan uji korelasi *Spearman's Rho*.

b. Analisis Data Kualitatif

Data yang diperoleh dianalisis dengan melihat, membandingkan, dan mendeskripsikan histologis ginjal mencit dari setiap kelompok perlakuan dengan kontrol. Parameternya adalah ukuran diameter tubulus, diameter lumen, serta ketebalan sel epitel.

