

BAB III**METODE PENELITIAN****3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Rumah Hewan Coba Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya sebagai tempat pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba. Laboratorium Histologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya untuk pembuatan sediaan ginjal. penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Agustus 2014 dan dilanjutkan pada bulan Agustus-Oktober 2015 (pembuatan sediaan ginjal).

3.2 Bahan dan Alat Penelitian**3.2.1 Bahan penelitian**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : Hewan coba yaitu mencit (*Mus musculus*) jantan strain BALB/C sebanyak 50 ekor berumur 8-9 minggu dengan berat badan 25-30 g yang diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Mencit diberi pakan ternak/pellet dan minum berupa air mineral, pericarp manggis (*Garcinia mangostana* L.), *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) 0,05% sebanyak 0,05 ml, larutan 2-ME dengan dosis 200 mg/kg BB, pelarut dengan kepolaran n-heksan (nonpolar), etilasetat (semipolar) dan metanol (polar). Bahan untuk membuat preparat ginjal yaitu fiksasi (*neutral buffered formalin* yang terdiri dari formaldehid, akuades, Na_2HPO_4 dan $\text{NaHPO}_4\text{H}_2\text{O}$), *washing* (air PDAM), *dehydration* (etanol 70%, 80%, 96%, etanol absolut, xylol I, xylol II), *embedding* (xylol : parafin, parafin I,

parafin II, parafin III), *trimming* (balok kayu, spiritus), *sectioning* (Mayer's albumin dan akuades), *staining* (xylol I, xylol II, etanol absolut 70%, 80%, 90%, *haematoxylin eosin*, etanol 70%+HCL, akuades, entellan).

3.2.2 Alat penelitian

Alat penelitian yang dipakai dalam penelitian ini adalah alat bedah, alat embedding, kaset, bunsen, *cutter*, mikrotom, *water bath*, *staining jar*, mikroskop OLYMPUS CX-21, *objective micrometer*, kamera DSLR CANON 1100D.

3.3 Variabel penelitian

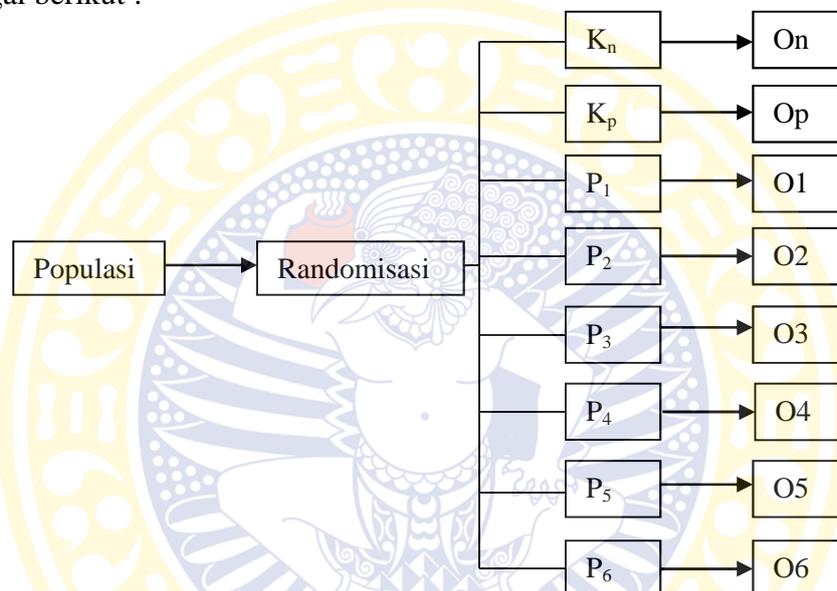
Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas, yaitu dosis fraksi pericarp manggis (*Garcinia mangostana*) dan jenis fraksi pericarp manggis (*Garcinia mangostana*).
2. Variabel terikat, yaitu persentase jumlah sel normal pada tubulus proksimal ginjal mencit (*Mus musculus*) dan persentase jumlah kerusakan sel epitel ginjal mencit (*Mus musculus*) meliputi degenerasi sel dan nekrosis.
3. Variabel kendali, yaitu strain mencit, jenis kelamin, umur, suhu udara, berat badan, dan jenis makanan mencit semuanya diseragamkan, serta perawatan dan sanitasi kandang.

3.4 Rancangan penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) ini terdiri dari satu kelompok kontrol negatif,

satu kelompok positif dan enam kelompok perlakuan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian fraksi pericarp manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap struktur penyusun sel ginjal mencit (*Mus musculus*) yang telah terpapar 2-ME dengan variasi tingkat kepolaran fraksi dan variasi dosis yang berbeda pada kelompok perlakuan terhadap kontrol, baik kontrol positif maupun kontrol negatif. Secara skematik, rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 3.1 Diagram Rancangan Penelitian.

Keterangan :

- K_n : Kelompok kontrol negatif (-), diberi perlakuan *Carboxyl Methyl Cellulosa (CMC)* 0,05% sebanyak 0,05 ml setiap satu hari sekali selama 40 hari secara injeksi *subcutan*.
- K_p : Kelompok kontrol positif (+), perlakuan 2-ME dengan dosis 200 mg/kg BB setiap satu kali sehari selama lima hari. Kemudian dilakukan pemberian *Carboxyl Methyl Cellulosa (CMC)* 0,05% sebanyak 0,05 ml selama 35 hari secara *subcutan*.
- P_1 : Kelompok perlakuan pertama, dengan diinjeksi secara *subcutan* menggunakan senyawa 2-ME dosis 200 mg/kg BB per hari selama lima hari, kemudian dilanjutkan pemberian ekstrak fraksi non polar

- (n-heksan) pericarp manggis dengan dosis 0,6 mg/kg BB yang dilarutkan dalam CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml setiap satu hari sekali selama 35 hari.
- P₂ : Kelompok perlakuan kedua, dengan diinjeksi secara *subcutan* menggunakan senyawa 2-ME dosis 200 mg/kg BB per hari selama lima hari, kemudian dilanjutkan pemberian ekstrak fraksi non polar (n-heksan) pericarp manggis dengan dosis 3 mg/kg BB yang dilarutkan dalam CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml setiap satu hari sekali selama 35 hari.
- P₃ : Kelompok perlakuan ketiga, dengan diinjeksi secara *subcutan* menggunakan senyawa 2-ME dosis 200 mg/kg BB per hari selama lima hari, kemudian dilanjutkan pemberian ekstrak fraksi semi polar (etil asetat) pericarp manggis dengan dosis 4 mg/kg BB yang dilarutkan dalam CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml setiap satu hari sekali selama 35 hari.
- P₄ : Kelompok perlakuan keempat, dengan diinjeksi secara *subcutan* menggunakan senyawa 2-ME dosis 200 mg/kg BB per hari selama lima hari, kemudian dilanjutkan pemberian ekstrak fraksi semi polar (etil asetat) pericarp manggis dengan dosis 20 mg/kg BB yang dilarutkan dalam CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml setiap satu hari sekali selama 35 hari.
- P₅ : Kelompok perlakuan kelima, dengan diinjeksi secara *subcutan* menggunakan senyawa 2-ME dosis 200 mg/kg BB per hari selama lima hari, kemudian dilanjutkan pemberian ekstrak fraksi polar (metanol) pericarp manggis dengan dosis 0,4 mg/kg BB yang dilarutkan dalam CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml setiap satu hari sekali selama 35 hari.
- P₆ : Kelompok perlakuan keenam, dengan diinjeksi secara *subcutan* menggunakan senyawa 2-ME dosis 200 mg/kg BB per hari selama lima hari, kemudian dilanjutkan pemberian ekstrak fraksi polar (metanol) pericarp manggis dengan dosis 2 mg/kg BB yang dilarutkan dalam CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml setiap satu hari sekali selama 35 hari.
- O1 : Data kelompok kontrol negatif setelah aklimasi.
- O2 : Data kelompok kontrol positif setelah perlakuan 40 hari.
- O3 : Data kelompok P₁ setelah perlakuan 40 hari.
- O4 : Data kelompok P₂ setelah perlakuan 40 hari.
- O5 : Data kelompok P₃ setelah perlakuan 40 hari.
- O6 : Data kelompok P₄ setelah perlakuan 40 hari.
- O7 : Data kelompok P₅ setelah perlakuan 40 hari.
- O8 : Data kelompok P₆ setelah perlakuan 40 hari.

Dasar penentuan dosis ini berdasarkan perbandingan berat serbuk ekstrak dari hasil penelitian Hayati *et al.*, 2014.

3.5 Perhitungan Jumlah Sampel

Jumlah unit penelitian yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan persamaan Federer : $(t-1)(r-1) = 15$, di mana t adalah banyaknya perlakuan dan r adalah jumlah replikasi. Dalam penelitian ini $t = 8$, sehingga dengan memakai rumus tersebut:

$$(t-1)(r-1) = 15$$

$$(8-1)(r-1) = 15$$

$$(7)(r-1) = 15$$

$$r-1 = \frac{15}{7}$$

$$r-1 = 2,14$$

$$r = 3,14, \text{ dilakukan pembulatan menjadi empat.}$$

Dalam rumus replikasi tersebut maka sampel minimal empat pengulangan dalam setiap perlakuan. Karena selama perlakuan kemungkinan terjadi kematian (f) 10% maka jumlah sampel ditambah menjadi enam pengulangan setiap perlakuan, sehingga jumlah keseluruhan sampel menjadi:

$$6 \times 8 = 48 \text{ sampel.}$$

3.6 Prosedur dan Pelaksanaan Penelitian

3.6.1 Pra-perlakuan sampel

Pra-perlakuan sampel yang dilakukan adalah penyiapan sampel. Buah manggis yang digunakan sebagai bahan baku dalam penelitian ini diberi perlakuan awal yang meliputi pemisahan kulit dari buah manggis, pengecilan ukuran dengan menggunakan alat *grinder* dan *blender*, kemudian diayak menggunakan mesh -

20+30. Setelah itu dilakukan pengeringan menggunakan oven pada temperatur 50°C dan pengecekan kadar air hingga kadar airnya $\pm 8-10\%$.

Pengecilan ukuran bertujuan untuk memperluas kontak antara padatan dan pelarut. Sedangkan tujuan pengeringan agar bahan baku dapat tahan lama serta mencegah terjadinya proses penjamuran. Alasan digunakan temperatur pengeringan yang tidak terlalu tinggi ($\pm 50^{\circ}\text{C}$) adalah untuk mencegah kemungkinan rusaknya senyawa antioksidan. Pada umumnya senyawa antioksidan rusak pada temperatur $60^{\circ} - 70^{\circ}\text{C}$.

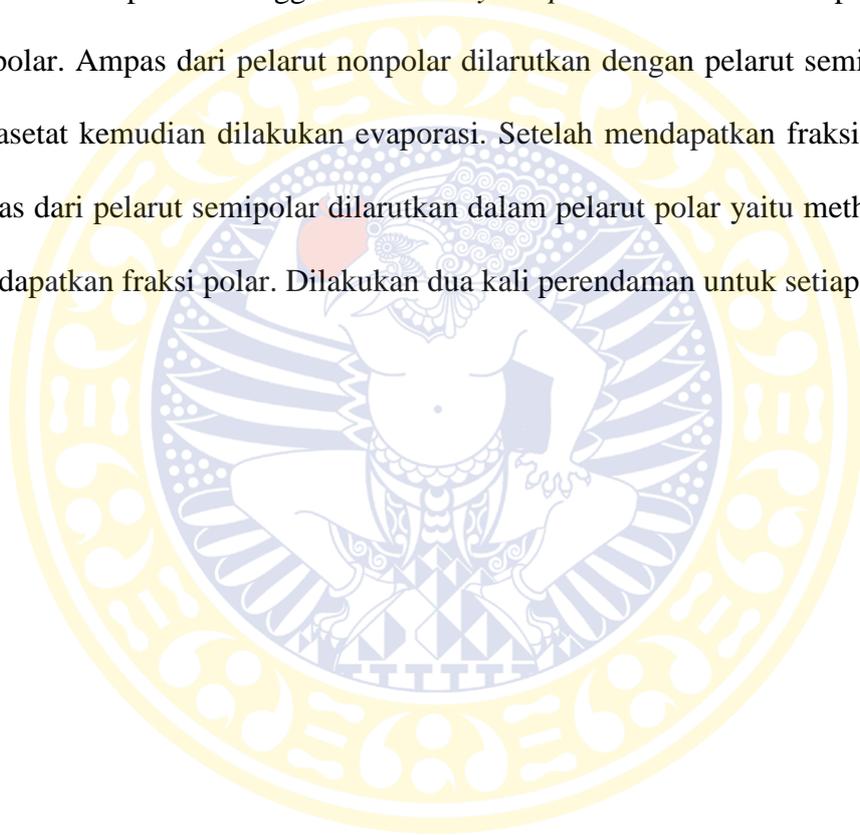
3.6.2 Pemeliharaan hewan coba

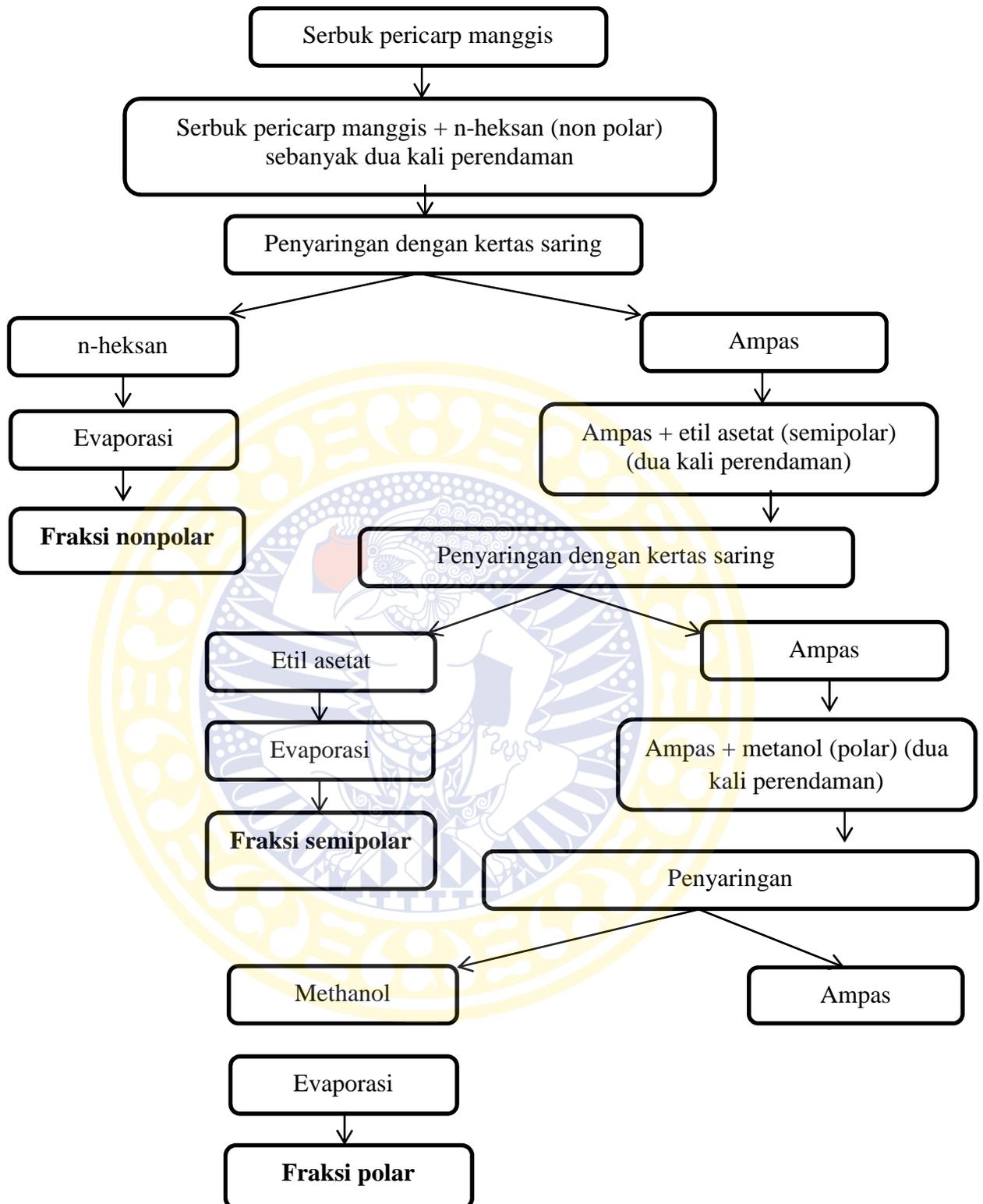
Mencit ditempatkan di kandang plastik yang luasnya disesuaikan dengan jumlah mencit, bagian atas ditutup dengan kawat kasa. Dasar kandang dilapisi dengan serbuk kayu. Cahaya ruangan dikontrol 12 jam terang (pukul 06.00 sampai dengan pukul 18.00) dan 12 jam gelap (pukul 18.00 sampai dengan 06.00). Sedangkan suhu dan kelembaban ruangan dibiarkan pada kisaran alamiah. Makanan (pellet komersial) dan minuman (air PDAM) disuplai setiap hari. Sebelum perlakuan pertama dimulai mencit diaklimasi terlebih dahulu selama 1 minggu.

3.6.3 Pembuatan fraksi pericarp manggis

Bagian pericarp manggis dipisahkan dari bagian buah dan biji. Selanjutnya pericarp diiris tipis dan dikering anginkan di bawah sinar matahari sampai kering benar. Irisan tipis pericarp manggis yang sudah dikeringkan diblender hingga

halus menjadi serbuk. Serbuk pericarp manggis ini selanjutnya ditimbang dan dimaserasi dengan larutan n-heksan untuk mendapatkan fraksi nonpolar, etil asetat untuk mendapatkan fraksi semipolar dan metanol untuk mendapatkan fraksi polar. Proses fraksinasi antioksidan dari pericarp manggis dilakukan dengan cara maserasi. Maserasi dilakukan pada suhu kamar selama 3x24 jam sampai mengendap. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring dan dilakukan evaporasi menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan fraksi nonpolar. Ampas dari pelarut nonpolar dilarutkan dengan pelarut semipolar yaitu etil asetat kemudian dilakukan evaporasi. Setelah mendapatkan fraksi semipolar, ampas dari pelarut semipolar dilarutkan dalam pelarut polar yaitu methanol untuk mendapatkan fraksi polar. Dilakukan dua kali perendaman untuk setiap pelarut.





Gambar 3.2 Diagram proses fraksinasi pericarp manggis

3.6.4 Penentuan dosis fraksi

Dasar penentuan dosis yaitu perbandingan berat serbuk ekstrak dari hasil penelitian Hayati *et al.*, 2014. Pada penelitian sebelumnya berat ekstrak yang didapatkan dari 1000 g serbuk adalah 293 g. dosis yang digunakan adalah 25, 50 dan 100 mg/kg BB. Pada penelitian ini didapatkan berat serbuk 2928,5 g, berat fraksi nonpolar, semipolar dan polar masing-masing 10,2 g, 67,9 g dan 7,7 g. kemudian dilakukan penyetaraan dosis dari berat serbuk ekstrak dari hasil sebelumnya (Hayati *et al.*, 2014) dengan fraksi yang didapatkan pada penelitian ini. Sehingga dosis yang digunakan untuk masing-masing fraksi yaitu fraksi nonpolar sebesar 0,6 mg/kg BB (dosis rendah) dan 3 mg/kg BB (dosis tinggi), fraksi semipolar 4 mg/kg BB (dosis rendah) dan 20 mg/kg BB (dosis tinggi), fraksi polar 0,4 mg/kg BB (dosis rendah) dan 2 mg/kg BB (dosis tinggi). Di jelaskan pada lampiran 1.

3.6.5 Pembuatan larutan 2-Methoxyethanol

Larutan 2-ME dengan dosis 200 mg/kg BB dibuat dengan melarutkan 2-ME murni ke dalam aquades steril. Cara pembuatan 2-ME dosis 200 mg/kg BB adalah sebagai berikut :

$$\begin{aligned}\text{Berat jenis () air} &= 1,00 \text{ g/mL} \\ \text{Berat jenis () 2-ME} &= 0,965 \text{ g/mL} \\ (\text{) air} : (\text{) 2-ME} &= 1,00 : 0,965 \\ &= 1,04 \text{ g/mL}\end{aligned}$$

Dosis 2-ME yang digunakan adalah per kgBB :

$$200 \text{ mg}/1000 \text{ mg} \times 1,04 \text{ mL} = 0,208 \text{ mg/mL}$$

Misalnya, berat badan rata-rata mencit adalah 25 gram, maka 2-Me yang diberikan kepada mencit tersebut adalah :

$$25/1000 \times 0,208 \text{ mL} = 0,005 \text{ mg/mL}$$

Larutan yang disuntikkan untuk seekor mencit adalah 0,05 mL yang didalamnya mengandung 0,005 mL 2-ME dan 0,045 mL aquades.

3.6.6 Perlakuan terhadap hewan coba

Pada penelitian ini mencit yang telah diaklimasi pada kondisi kandang selama satu minggu dipilih secara acak, kemudian dikelompokkan menjadi delapan kelompok yang terdiri dari satu kelompok kontrol positif, satu kelompok negatif, dan enam kelompok perlakuan ekstrak fraksi pericarp manggis. Kelompok kontrol negatif (K-) diberi perlakuan dengan pemberian CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml selama 40 hari. Kelompok kontrol positif (K+) diberi perlakuan dengan 2-ME 200 mg/kg BB setiap satu kali sehari selama 5 hari, kemudian diberi CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml selama 35 hari secara *subcutan*.

Kelompok perlakuan pertama (P1) diberi perlakuan dengan 2-ME 200 mg/kgBB setiap satu kali selama 5 hari, kemudian pemberian fraksi n-heksan pericarp manggis dengan 0,6 mg/kg BB yang dilarutkan dalam CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml selama 35 hari secara *subcutan*. Kelompok perlakuan kedua (P2) diberi perlakuan dengan 2-ME 200 mg/kg BB setiap satu kali selama 5 hari, kemudian pemberian fraksi n-heksan pericarp manggis dengan 3 mg/kg BB yang dilarutkan dalam CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml selama 35 hari secara *subcutan*.

Kelompok perlakuan ketiga (P3) diberi perlakuan dengan 2-ME 200 mg/kg BB setiap satu kali selama 5 hari, kemudian pemberian fraksi etil asetat pericarp manggis dengan 4 mg/kg BB yang dilarutkan dalam CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml selama 35 hari secara *subcutan*. Kelompok perlakuan kelima (P4) diberi perlakuan dengan 2-ME 200 mg/kg BB setiap satu kali selama 5 hari, kemudian pemberian fraksi etil asetat pericarp manggis dengan 20 mg/kg BB yang dilarutkan dalam CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml selama 35 hari secara *subcutan*. Kelompok perlakuan kelima (P5) diberi perlakuan dengan 2-ME 200 mg/kg BB setiap satu kali selama 5 hari, kemudian pemberian fraksi metanol pericarp manggis dengan 0,4 mg/kg BB yang dilarutkan dalam CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml selama 35 hari secara *subcutan*. Kelompok perlakuan keenam (P6) diberi perlakuan dengan 2-ME 200 mg/kg BB setiap satu kali selama 5 hari, kemudian pemberian fraksi metanol pericarp manggis dengan 2 mg/kg BB yang dilarutkan dalam CMC 0,05% sebanyak 0,05 ml selama 35 hari secara *subcutan*.

3.7 Prosedur Pengumpulan Data

3.7.1 Pembedahan hewan coba

Proses pembedahan dilakukan pada hari ke-41, hewan coba dieutanasi menggunakan kloroform, kemudian dibentangkan di atas papan parafin dengan anggota gerak difiksasi. Mencit dibedah pada bagian abdomen, selanjutnya ginjal di ambil dan dipisahkan dari jaringan yang lain yang berada di sekitarnya, setelah mendapatkan ginjal, kemudian difiksasi dalam buffer formalin 10%.

3.7.2 Pembuatan sediaan ginjal

Organ ginjal yang telah dimasukkan dalam larutan Bouin, kemudian dibuat histologinya dengan pewarnaan *hematoxilin-eosin*, dengan tahap-tahap sebagai berikut:

1. Fiksasi

Ginjal yang telah diperoleh dari hewan difiksasi dengan buffer formalin minimal 2x24 jam hingga tahap selanjutnya.

2. Pencucian (*Washing*)

Organ ginjal dimasukkan dalam larutan alkohol 70% yang mengandung litium karbonat *overnight*.

3. Dehidrasi (*Dehydration*)

Organ ginjal berturut-turut dimasukkan dalam larutan alkohol 70% (selama 4x30 menit), alkohol 80% (2x30 menit), alkohol 96% (30 menit) dan terakhir alkohol absolut (30 menit).

4. Penjernihan (*Clearing*)

Organ ginjal kemudian berturut-turut dimasukkan dalam xylol 1 (selama 15 menit) dan xylol 2 (*overnight*), kemudian dilanjutkan dengan proses infiltrasi yaitu dengan memasukkan organ ginjal berturut-turut pada xylol : parafin = 1 : 1 (selama 30 menit), parafin murni I (1 jam), parafin II (1 jam), dan terakhir parafin murni III (1 jam).

5. Penanaman (*Embedding*)

Dari parafin III diatas, lalu dibuat blok-blok parafin, dengan cara memasukkan parafin cair III ke dalam kotak-kotak kecil dan organ

dimasukkan kedalamnya, kemudian dibiarkan hingga dingin dan mengeras.

6. Pemotongan spesimen (*Sectioning*)

Spesimen dipotong dengan ketebalan 5 μm menggunakan mikrotom hingga membentuk pita. Pita disusun dalam gelas obyek (*affixing*) yang sebelumnya diolesi dengan *Mayer's Albumin*, lalu dilewatkan di atas nyala bunsen supaya pita melekat. Setelah itu dimasukkan dalam oven bersuhu 40°-50° C *overnight*.

7. Pewarnaan (*Staining*)

Setelah dioven preparat dimasukkan ke dalam xylol 1 selama 10 menit kemudian dimasukkan ke dalam serangkaian alkohol bertingkat mulai dari alkohol absolut, alkohol 96%, alkohol 80% alkohol 70% masing-masing selama 5 menit. Kemudian preparat dimasukkan ke dalam *haematoxylin* selama 10 menit, setelah itu dicuci dengan air mengalir dan dimasukkan ke dalam alkohol 70% + HCl selama 30 detik, kemudian dicuci dengan aquades. Kemudian preparat dimasukkan ke dalam *eosin* selama 2-5 menit, setelah itu cuci dengan aquades. Kemudian di dehidrasi mulai dari alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, alkohol absolut masing-masing selama 5 menit dan dilanjutkan dengan memasukkan preparat ke dalam xylol 1 selama 5 menit, dilanjutkan dengan memasukkan ke dalam xylol 2 selama 2x10 menit.

8. Penutupan (*Mounting*)

Setelah preparat diwarnai, preparat yang ada di gelas obyek diberi entellan kemudian ditutup menggunakan cover glass.

9. Penamaan (*Labelling*)

Setelah penutupan preparat, selanjutnya pemberian label pada preparat dengan mencantumkan nama preparat (kelompok perlakuan), ketebalan dan jenis pewarnaannya.

3.7.3 Pengamatan dan pengumpulan data

Sediaan ginjal diamati di bawah mikroskop dalam 4 lapangan pandang. Dengan batasan yang diamati dalam penelitian ini adalah tubulus kontortus proksimal ginjal yang mengalami kerusakan dengan potongan melintang (*cross section*). Penghitungan kuantitatif terhadap kerusakan tubulus proksimal ginjal yaitu jumlah sel tubulus proksimal yang normal atau rusak dalam satu lapangan pandang dibagi jumlah total sel tubulus proksimal dalam satu lapangan pandang, kemudian dikalikan 100% pada perbesaran 400x. Setelah didapat hasil persentase dari keempat lapangan pandang, dihitung rata-rata persentasenya. Kemudian hasilnya dirata-rata untuk mendapatkan persentase derajat kerusakan ginjal di setiap mencit (Sihardo, 2006). Pengulangan pengamatan per sampel dilakukan sebanyak 10x untuk mengurangi tingkat kesalahan dalam penghitungan dan untuk mendapatkan hasil yang representatif dan akurat.

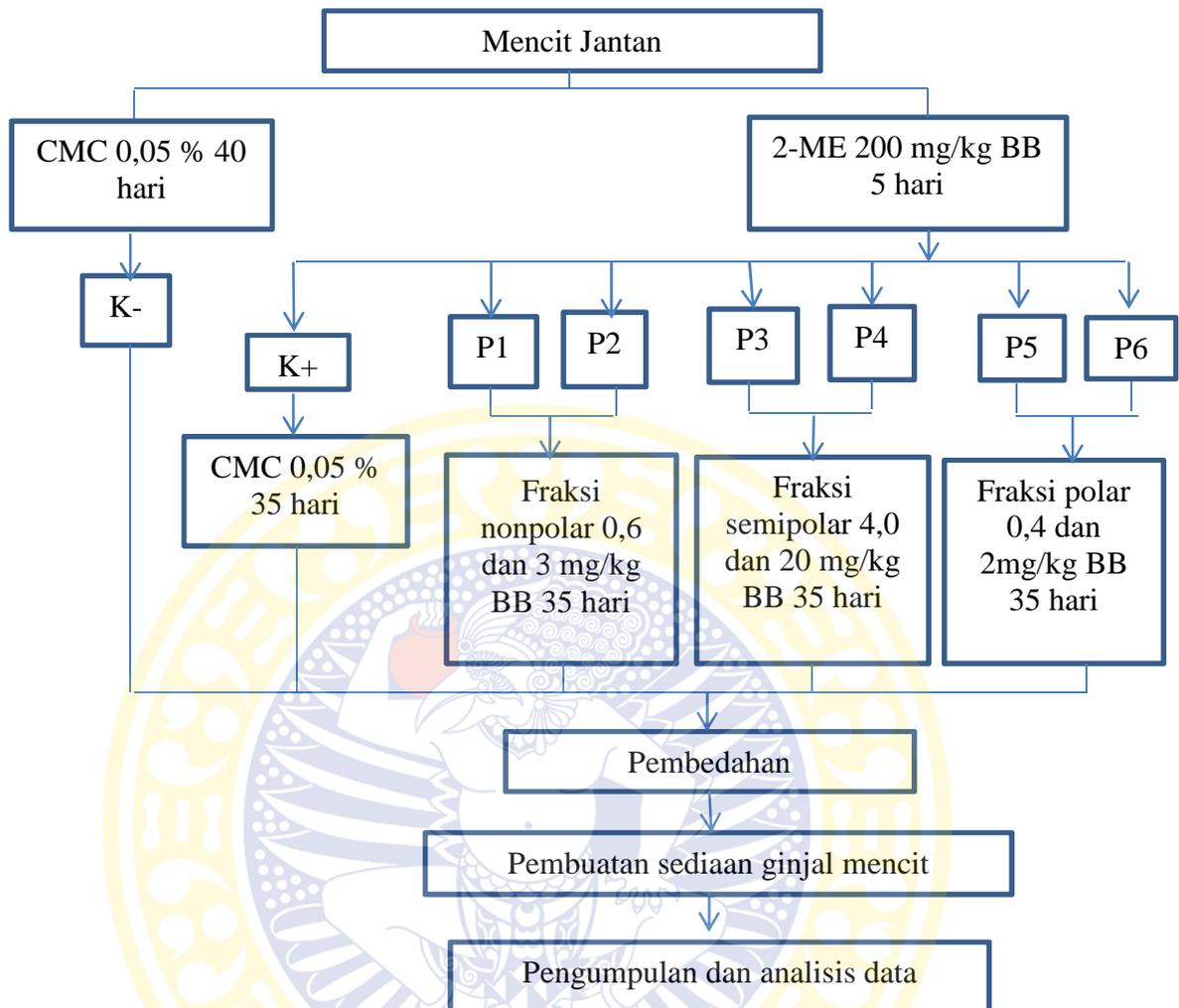
Perhitungan jumlah sel tubuli sesuai tiga kriteria sel tubuli ginjal yaitu : sel normal, bengkak keruh (*cloudy swelling*), dan nekrosis. Ciri-ciri sel yang normal

yaitu sel-sel ginjal utuh, lengkap dengan tubulus serta tidak ada nekrosis, sumbatan maupun kebocoran. Ciri-ciri sel yang mengalami bengkak keruh yaitu dengan adanya penimbunan air dan metabolit dalam sitoplasma yang tampak keruh sehingga menyebabkan lumen tubulus proksimal mengalami penyempitan. Sedangkan ciri-ciri nekrosis meliputi piknotik, karioreksis dan kariolisis. Piknotik ditandai dengan pengerutan inti, inti tampak lebih padat dan berwarna gelap hitam. Karioreksis ditandai dengan inti hancur, membentuk fragmen kromatin yang menyebar. Kariolisis ditandai dengan inti yang mulai hilang hingga sulit dikenali secara mikroskopis dan warna menjadi tidak jelas setelah dilakukan pewarnaan.

3.7.4 Analisis data

Data yang diperoleh (berupa data primer) dari hasil perubahan gambaran histologi ginjal (tubulus proksimal) mencit (*Mus musculus*). Analisis data dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) 21.0 for Windows. Data dianalisis secara statistik. Sebelum dilakukan uji statistik, semua data dianalisis normalitas dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan untuk mengetahui homogenitas variansi maka dianalisis menggunakan *Homogeneity of Variances*. Jika didapatkan distribusi data normal ($p > 0,05$) dan variansi tidak homogen ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji *Brown-Forsythe*. Jika hasil uji *Brown-Forsythe* menunjukkan nilai ($p < 0,05$) maka analisis dilanjutkan uji *Games-Howell*.

3.8 Kerangka Prosedur Penelitian



Gambar 3.3 Prosedur penelitian