

BAB 3
MATERI DAN METODE

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 16 Januari 2007 sampai 25 Maret 2007 di Kandang Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Pembuatan histopatologi ginjal mencit dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga sedangkan pemeriksaan kadar kalsium dalam darah mencit dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah mencit betina berumur kurang lebih 7 sampai 8 bulan, berjumlah sebanyak 18 ekor dari Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Sebelum digunakan penelitian, mencit terlebih dahulu diadaptasikan selama satu minggu. Selama adaptasi dan penelitian mencit diberi pakan dan minum secara *ad-libitum*.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang dipakai dalam penelitian ini adalah: susu skim dengan kalsium antara 1.500 mg sampai dengan 2000 mg / 100 g (1.666,67 mg / 100 g) susu skim dengan kalsium lebih dari 2000 mg / 100 g (2.400 mg / 100 g) dan air hangat.

Bahan yang diperlukan dalam pembuatan histopatologi ginjal mencit antara lain: formalin 10% (untuk fiksasi), alkohol 70%, 80%, 95%, 96% dan alkohol absolut I dan II (untuk dehidrasi); xylol I – II – III (untuk clearing); larutan parafin cair I – II – III (untuk embeeding); gliserin; putih telur; canada balsam dan untuk pewarnaan adalah xylol I – II; alkohol absolut I – II; alkohol 96%, 80%, 70%; zat warna Harris HE, acid alkohol, amoniak, aquadest dan eosin.

Bahan yang diperlukan dalam pemeriksaan kadar kalsium dalam darah mencit antara lain: reagen *phosphat buffer*, *8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid*, *arsenazo III*, deterjen dan standar kalsium.

3.2.3 Alat Penelitian

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit sebanyak tiga buah yang berupa bak plastik dengan ukuran panjang: 45 Cm, lebar: 20 Cm dan tinggi: 10 Cm, tutup dari anyaman kawat, botol tempat minum dan mangkok plastik tempat pakan. Pembedahan (pengambilan ginjal) menggunakan pinset, gunting, *scalpel* dan papan kayu. S spuit tuberkulin 1 ml dan jarum sonde digunakan untuk pemberian susu skim secara per-oral pada mencit. Timbangan, gelas kaca, sendok, kalkulator untuk membuat susu skim berkalsium tinggi. Pipet

mikrohematokrit (tanpa heparin), tabung *microcentrifuge* dan kapas untuk mengambil darah mencit.

Alat yang digunakan dalam pembuatan histopatologi ginjal mencit antara lain: tissue processor (mulai dari fiksasi sampai dengan embedding), cetakan besi untuk pembuatan blok parafin, mikrotom, water bath, gelas objek, gelas penutup dan mikroskop. Alat yang digunakan dalam pemeriksaan kalsium dalam darah mencit antara lain: photometer, tabung reaksi, mikropipet.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Perlakuan Hewan Coba

Pada tahap persiapan mencit diadaptasikan selama 7 hari dengan pemberian pakan pelet anak ayam *Hi-Pro-Vite Medicated* produksi P.T. Charoen Pokphand dan jagung serta minum secara *ad-libitum*, kemudian dilakukan pemilihan secara acak untuk menentukan kelompok kontrol (P_0), kelompok perlakuan I (P_1) dan kelompok perlakuan II (P_2) setiap perlakuan terdiri dari 6 ekor mencit. Pembagian kelompok dan perlakuannya adalah sebagai berikut :

P_0 : kelompok tanpa pemberian susu skim berkalsium tinggi

P_1 : kelompok dengan pemberian susu skim yang mengandung kalsium antara 1.500 mg sampai dengan 2.000 mg / 100 g

P_2 : kelompok dengan pemberian susu skim yang mengandung kalsium lebih dari 2.000 mg / 100 g

Susu skim berkalsium tinggi tersebut diberikan secara per-oral dua kali sehari (pagi dan sore), dengan dosis 0,5 ml tiap satu kali pemberian selama 2 bulan.

3.3.2 Penentuan Dosis

3.3.2.1 Penentuan Dosis Susu Skim yang Mengandung Kalsium antara

1.500 mg sampai dengan 2.000 mg / 100 g

$$\begin{array}{rcc}
 \text{Satu gelas} = 180 \text{ ml air hangat} + 30 \text{ g bubuk} & \leftrightarrow & \text{pada manusia} \\
 \downarrow & \times 0,0026 & \downarrow \\
 0,468 \text{ ml air hangat} + 0,078 \text{ g bubuk} & \leftrightarrow & \text{pada mencit}
 \end{array}$$

Kebutuhan harian minimum kalsium pada manusia adalah dengan mengkonsumsi dua gelas setiap hari, jadi pada mencit diberikan sebanyak 0,468 ml \approx 0,5 ml dua kali sehari.

3.3.2.2 Penentuan Dosis Susu Skim yang Mengandung Kalsium lebih dari

2.000 mg / 100 g

$$\begin{array}{rcc}
 \text{Satu gelas} = 200 \text{ ml air hangat} + 25 \text{ g bubuk} & \leftrightarrow & \text{pada manusia} \\
 \downarrow & \times 0,0026 & \downarrow \\
 0,52 \text{ ml air hangat} + 0,065 \text{ g bubuk} & \leftrightarrow & \text{pada mencit}
 \end{array}$$

Kebutuhan harian minimum kalsium pada manusia adalah dengan mengkonsumsi dua gelas setiap hari, jadi pada mencit diberikan sebanyak 0,52 ml \approx 0,5 ml dua kali sehari.

3.3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan tiga macam perlakuan dan masing – masing perlakuan enam kali ulangan. Rancangan percobaan dilakukan setelah pemeriksaan kalsium dalam darah mencit yang telah mendapatkan perlakuan, untuk mengetahui perubahan kadar kalsium dalam darah mencit. Hasil gambaran histopatologi ginjal mencit menggunakan statistik non parametrik, karena data yang dihasilkan berupa data nominal.

3.3.4 Analisis Data

Hasil pengamatan diperoleh berdasarkan hasil pemeriksaan kalsium dalam darah mencit dan hasil gambaran histopatologi ginjal mencit setelah mendapat perlakuan. Analisis data yang dipergunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian susu skim berkalsium tinggi pada setiap kelompok perlakuan terhadap perubahan kadar kalsium dalam darah mencit dilakukan dengan menggunakan uji-t 2 sampel yang berhubungan dan Analisis Varian (Anava), apabila dalam analisis tersebut terdapat perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan uji BNT 5% (Kusriningrum, 1989). Pengaruh pemberian susu skim berkalsium tinggi pada setiap kelompok perlakuan terhadap gambaran histopatologi ginjal mencit dapat dilakukan dengan menggunakan uji Kruskal Wallis, dan apabila ada perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji Pasangan Berganda atau uji Z dengan taraf signifikansi 5% (Daniel, 1989).