

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 Genetika Molekuler Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga digunakan sebagai tempat pembuatan ekstraksi jamur *C. versicolor*, serbuk jamur *C. versicolor*, penyaringan larutan jamur *C. versicolor*, pembedahan terhadap hewan coba, isolasi dan pemurnian polisakarida krestin, dan pengukuran kadar kreatinin hewan coba. Pembuatan ekstrak kering jamur *C. versicolor* dilakukan di *Institute Tropical Disease*. Pengamatan preparat histologi ginjal hewan coba dilakukan di Laboratorium Histologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Penelitian ini dilakukan selama 7 bulan, yaitu dari bulan Januari-Juli 2012.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Hewan coba

Penelitian ini menggunakan 24 ekor mencit jantan dewasa jenis strain BALB/C, berumur 8-10 minggu, berat badan berkisar 25-30 gram yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma, jalan Ahmad Yani Surabaya.

3.2.2 Jamur *Coriolus versicolor*

Jamur *C. versicolor* diperoleh dari hutan Mojokerto dan Jombang. Ciri-ciri jamur *C. versicolor* yang digunakan adalah berbentuk seperti kipas dengan tepi bergelombang. Tubuh buah yang masih muda bersifat lunak. Permukaan atas tubuh buahnya beludru dengan zona konsentris multi warna, yaitu coklat, kuning, abu-abu, kehijauan, atau hitam. Permukaan tubuh buahnya berwarna putih berpori kecil-kecil, biasanya hidup di batang dan cabang kayu yang telah mati.

3.2.3 Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak jamur *C. versicolor*, *pellet hi-pro-vite* sebagai pakan mencit, air PDAM sebagai air minum hewan coba, dan sekam sebagai alas kandang. Bahan yang digunakan untuk isolasi dan pengukuran kadar polisakarida krestin (PSK) adalah akuades, akuabides, ammonium sulfat, *phosphate buffered saline* (PBS), *fenol* dan *sulphuric acid*. Bahan yang digunakan untuk pembuatan sediaan histologi ginjal dengan fiksasi NaCl, buffer formalin (terdiri dari formaldehid, akuades, Na_2HPO_4 dan $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), metode parafin (etanol 70%, 80%, 90%, etanol absolut, etanol 70%+HCl, xylol etanol, xylol, xylol parafin, parafin, entellan, *Mayer's albumin* dan akuades) dan pewarna *hematoxylin eosin*. Bahan yang digunakan untuk mengukur kadar kreatinin yaitu serum mencit, asam pikrat, standard kreatinin, *sodium hydroxyde*.

3.2.4 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kandang untuk hewan coba berupa bak plastik 30x13x19 yang disekat dengan tutup kawas kasa, dengan

kapasitas tiap kandang berisi 3 hewan coba, peralatan bedah, jarum injeksi no. 26 G, cawan petri, timbangan digital *Boeco*, blender, tabung dialisis, gelas ukur, gelas beker, sentrifuge, tabung Erlenmeyer, *rotary vacuum evaporator*, *Whatman paper* no. 41, *freeze drying*, mikroskop, jarum pentul, objek gelas, *cover glass*, *paraffin bath*, *mikrotom*, *vortex*, *water bath*, kompor listrik, panci dan gelas pengaduk. Alat untuk pengukuran kadar kreatinin yaitu tabung reaksi, spektrofotometer, *centrifuge*, *clinipet* dan *graticulae*.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1 Tahap aklimasi hewan coba

Dua puluh empat ekor hewan coba mencit (*Mus musculus*) diaklimasi selama 7 hari dalam rumah hewan. Setiap 3 ekor mencit ditempatkan dalam sebuah bak plastik yang beralaskan sekam dan dilengkapi kawat jaring sebagai penutup, diberi pakan dan minum yang sama yaitu *pellet hi-pro-vite medicated* 594 dan air PDAM.

3.3.2 Tahap koleksi dan pembuatan serbuk jamur *Coriolus versicolor*

Tubuh buah dari jamur *Coriolus versicolor* dikoleksi dari daerah Lamongan, Surabaya, Jombang dan Sidoarjo. Umumnya jamur ini ditemukan pada bongkahan kayu yang telah mati dan biasanya tumbuh saat musim hujan. Jamur yang telah diperoleh diidentifikasi, kemudian dicuci dengan air sampai bersih kemudian dikering-anginkan. Selanjutnya, jamur dipotong kecil-kecil lalu dimasukkan ke dalam oven pada suhu 40⁰ C selama 24 jam untuk menghilangkan kandungan airnya. Setelah 24 jam, jamur dihaluskan dengan cara diblender sampai menjadi serbuk kasar.

3.3.3 Tahap pembuatan ekstrak jamur *Coriolus versicolor*

Pembuatan ekstrak jamur *Coriolus versicolor* dilakukan menurut metode Cui dan Christi (2003) dalam Wahyuningsih *et al.*, (2009) dengan cara sebagai berikut: serbuk kasar sebanyak 200 gram ditambah air sebanyak 3 liter dan dipanaskan pada suhu 80⁰-98⁰ C selama 2-3 jam untuk melarutkan polisakarida. Kemudian, supernatan disaring dengan menggunakan saringan. Selanjutnya disaring lagi menggunakan kertas saring. Residu yang ada diambil untuk diekstrak lagi sebanyak 2 kali ekstraksi dengan penambahan air sebanyak 2 liter untuk tiap ekstraksi dan dipanaskan pada suhu 80⁰-98⁰ C selama 2 jam. Hasil yang didapat berupa supernatan dari ketiga ekstraksi ± 2 liter dan disimpan dalam suhu 4⁰ C.

3.3.4 Tahap isolasi polisakarida krestin (PSK)

Isolasi polisakarida krestin dilakukan menurut Cui dan Christi (2003) dalam Wahyuningsih *et al.*, (2009) dengan cara sebagai berikut: larutan ekstrak jamur difiltrasi menggunakan kertas *Whatman* no.41 dengan corong *buchner* dan vakum kemudian diambil supernatannya. Supernatan diliofilisasi menggunakan *freeze dryer*, untuk 150 ml dilakukan liofilisasi selama ± 24 jam (Lampiran 1). Kemudian serbuk kering ekstrak jamur dipresipitasi menggunakan ammonium sulfat 90% dengan menimbang 30 gr ammonium sulfat yang dilarutkan dalam akuades 50 ml kemudian diresuspensi menggunakan mikropipet. Kemudian dilakukan penambahan ekstrak jamur kering sebanyak 1 gram kemudian distirer selama ± 20 menit pada suhu 4⁰ C selanjutnya disentrifus (9000 rpm/40 menit, 4⁰ C) dan diambil peletnya. Pelet dilarutkan dengan 30 ml larutan salin selanjutnya

didialisis menggunakan membran nitroselulosa selama 24 jam di dalam PBS pada suhu 4⁰ C. Kemudian dilanjutkan *freeze drying* kembali.

3.3.5 Tahap penentuan konsentrasi polisakarida krestin dengan *phenol sulphuric acid assay*

Pembuatan konsentrasi polisakarida krestin dengan menggunakan blanko yang berisi 100 µl akuades dan sampel berisi 50 µl PSK dan 50 µl akuades. Blanko dan sampel ditambahkan dengan 50 µm larutan fenol 80% kemudian dihomogenkan. Masing-masing tabung ditambah dengan asam sulfat 2 ml dan didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar. Nilai *optical density* (OD) masing-masing tabung dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 490 nm. Nilai OD yang didapat dimasukkan ke dalam regresi linier.

3.3.6 Tahap perlakuan pada hewan coba

Pemberian PSK pada hewan coba dilakukan dengan menempatkan mencit pada kandang yang berventilasi yang cukup baik. Mencit diaklimasi selama 7 hari, kemudian dikelompokkan menjadi 4 kelompok yang masing-masing berjumlah 6 ekor yang berdasarkan rumus Federer (1963) dalam Anggraini, 2010:

$$\begin{aligned}(t-1)(n-1) &\geq 15 \\ 3(n-1) &\geq 15 \\ n-1 &\geq 15/3 \\ n &\geq 5+1 \\ n &\geq 6\end{aligned}$$

Keterangan:

t = jumlah perlakuan (4 perlakuan)

n = jumlah replikasi

Dosis PSP yang digunakan oleh Jian (1999) dalam Cheng dan Leung (2008) selama uji toksisitas kronik dan subkronik adalah 0, 1,5, 3 dan 6 mg/kg BB. Pada uji toksisitas subkronik PSP diberikan secara oral selama 62 hari. Pada perlakuan hewan coba ini dilakukan selama 62 hari dengan jalur pemberiannya secara oral dengan tingkatan dosis 1,5, 3 dan 6 mg/kg BB dan perlakuan kontrol. Kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Kelompok perlakuan hewan coba

Kelompok	Perlakuan pada hewan coba
P0 (kontrol)	PSK ekstrak <i>C. versicolor</i> sebanyak 0 mg/kg BB
P1	PSK ekstrak <i>C. versicolor</i> sebanyak 1,5 mg/kg BB
P2	PSK ekstrak <i>C. versicolor</i> sebanyak 3 mg/kg BB
P3	PSK ekstrak <i>C. versicolor</i> sebanyak 6 mg/kg BB

3.3.7 Tahap pembuatan sediaan ginjal

Hewan coba dikorbankan dengan cara pembiusan menggunakan kloroform, kemudian dibedah untuk mengambil organ ginjal. Organ ginjal yang diambil kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis, selanjutnya difiksasi dengan menggunakan buffered formalin 10%.

Pembuatan sediaan ginjal dengan menggunakan parafin, yaitu dengan langkah-langkah berikut:

1. Fiksasi

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

2. Pencucian (*washing*)

Ginjal yang telah difiksasi dengan buffer formalin, diambil, diletakkan dalam kaset-kaset dan dicuci dengan cara meletakkannya ke dalam wadah kemudian dialiri menggunakan air kran selama 2 jam.

3. Dehidrasi (*dehydration*)

Ginjal didehidrasi dengan mencelupkannya ke dalam larutan etanol berseri mulai dari konsentrasi 70% (4x30 menit), 80% (2x30 menit), 96% (30 menit), dan etanol absolut (30 menit).

4. Penjernihan (*clearing*)

Penjernihan ginjal dengan cara memasukkan ginjal ke dalam larutan xilol I (15 menit), xilol II over night.

5. Infiltrasi

Ginjal diinfiltrasi dengan memasukkannya ke dalam xilol parafin = 1:1 selama (30 menit), parafin murni I, II, III masing-masing selama 60 menit.

6. Penanaman (*embedding*)

Menyiapkan wadah kotak-kotak dari kertas untuk pembuatan blok, memasukkan parafin cair III ke dalam kotak-kotak kecil, kemudian ginjal dimasukkan dan diatur posisinya di dalam kotak tersebut, dan dibiarkan sampai dingin dan mengeras.

7. Penyayatan (*sectioning*)

Ginjal dalam blok parafin disayat menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5 μm hingga membentuk pita-pita. Pita yang terbentuk

diletakkan di atas obyek gelas yang telah diolesi dengan *Mayer's* albumin. Kemudian dimasukkan ke dalam oven bersuhu 56-60⁰ C selama 24 jam.

8. Pewarnaan (*staining*)

Setelah dioven, preparat ginjal dimasukkan ke dalam larutan xilol (2x10 menit), etanol absolut, etanol 96%, etanol 80%, dan etanol 70% masing-masing selama 5 menit, larutan *Hematoxylin* (10 menit) lalu dibilas menggunakan air mengalir, etanol 70% + HCl (30 detik), *Eosin* (5 menit), akuades (5 menit), etanol 70%, etanol 80%, etanol 96%, etanol absolut masing masing selama 5 menit, dan terakhir dimasukkan ke dalam xilol I dan II (2x10 menit).

9. Penutupan (*mounting*)

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

10. Penamaan (*labelling*)

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

3.3.8 Tahap pengamatan ginjal

1. Pengamatan secara makroskopis

Pengamatan makroskopis ginjal meliputi berat, warna, permukaan, dan konsistensi. Ginjal yang normal berwarna merah kecoklatan, permukaannya licin dan konsistensinya kenyal (Anggraini, 2008).

2. Pengamatan secara mikroskopis

Pengamatan preparat ginjal di bawah mikroskop menggunakan *graticulae*. Tiap preparat dibagi dalam lima zona lapang pandang, bagian yang diamati adalah daerah kortek, kemudian tiap zona diamati di bawah mikroskop binokular dengan perbesaran 400x. Penghitungan jumlah sel tubuli sesuai 3 kriteria sel tubuli ginjal yaitu: *sel normal, pembengkakan dan nekrosis sel epitel tubulus*. Ciri-ciri sel yang mengalami pembengkakan sel yaitu (*cloudy swelling*) dengan adanya penimbunan air dan metabolit dalam sitoplasma yang tampak keruh. Sedangkan ciri-ciri nekrosis meliputi piknotik, karioreksis dan kariolisis. Piknotik ditandai dengan penggumpalan kromatin dan tidak lagi dikenali anak inti, inti tampak lebih padat dan berwarna gelap hitam. Karioreksis ditandai dengan terjadinya kerusakan pada inti yaitu inti pecah berkeping-keping sehingga bentuknya tidak teratur. Kariolisis ditandai dengan inti yang mulai hilang hingga sulit dikenali secara mikroskopis, bentuk sel memanjang dan warna menjadi tidak jelas setelah dilakukan pewarnaan (Robbins *et al*, 1995)

3.3.9 Tahap pengukuran kadar kreatinin

1. Tahap pengambilan serum

Pengambilan serum mencit dilakukan dengan cara mengambil darah melalui jantung (*intracardiac*) dan menampungnya dalam tabung *eppendorf*. Darah dalam tabung *eppendorf* dibiarkan dalam posisi miring pada suhu kamar selama dua jam, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 15 menit pada suhu 4⁰ C hingga terbentuk dua fase dan memisahkannya dari darah dan dikoleksi.

2. Cara pembuatan reagen

Metode yang digunakan dalam pengukuran kadar kreatinin adalah *Jaffe reaction*. Reagen 1 (*sodium hydroxide*) 1000 μL ditambahkan pada sampel (serum) dicampur dan diinkubasi selama 5 menit, kemudian ditambah dengan Reagen II (asam pikrat) 250 μL , dicampur dan dibaca absorbansinya (AI) setelah 60 detik dan absorbansi kedua (AII) dibaca setelah 120 detik. Pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 492 nm. Penghitungan kadar kreatinin dengan menggunakan rumus, sebagai berikut:

$$\text{Kreatinin [mg/dL]} = \frac{\Delta A}{\Delta \text{Std}} \times \text{Conc. Std} \left[\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right]$$

Keterangan:

ΔA = A2-A1 (absorbansi 1- absorbansi 2) sampel atau standard

Conc. Standard = 2 mg/dL

Menurut Hall (2007) kadar kreatinin normal pada mencit adalah 0,2–0,9 mg/dL.

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan percobaan eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pada 4 kelompok percobaan dengan 6 kali ulangan

3.5 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Variabel bebas: yaitu dosis PSK yang diberikan pada masing-masing kelompok perlakuan.

2. Variabel terikat: yaitu jumlah kerusakan sel tubuli dan kadar kreatinin serum.
3. Variabel terkendali: yaitu kondisi, suhu kandang, berat badan, umur, strain hewan coba, jenis pakan, air minum, dan perlakuan.

3.6 Cara Mengumpulkan Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini merupakan data primer dan data pendukung dari pengamatan hewan coba, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Data primer yang akan diperoleh yaitu jumlah sel tubuli (%) normal, pembengkakan, nekrosis dan kadar kreatinin pada tiap hewan coba, sedangkan data pendukung yaitu gambaran makroskopis ginjal berupa berat, warna, permukaan, dan konsistensi.

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah menggunakan program komputer SPSS *for Windows*. Data dianalisis normalitas dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnof* dan untuk mengetahui homogenitas data maka dianalisis menggunakan *Homogeneity of Variances* jika didapatkan distribusi data normal dan variansi homogen ($p > 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji Anova. Jika hasil analisis Anova menunjukkan nilai $p < 0,05$ maka analisis dilanjutkan menggunakan uji *post hoc* yaitu uji *Duncan*.