

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Perlakuan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Progam Studi Farmasi Universitas Darussalam Gontor. Pembuatan sediaan infusa Daun Afrika dilakukan di Laboratorium Kimia Analisis Progam Studi Farmasi Universitas Darussalam Gontor. Pembuatan sediaan preparat histologi ginjal dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajdah Mada. Pembacaan preparat ginjal dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penelitian ini dilakukan selama 8 bulan, mulai dari bulan Agustus 2017 sampai Maret 2018.

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit, panci lapis enamel, termometer, gelas beaker, gelas ukur, batang pengaduk, kompor listrik, timbangan analitik, erlenmeyer, spuit injeksi oral 1 ml, blender, kain flanel, papan bedah, bak plastik, tempat minum, kanul, mikroskop cahaya listrik merk Olympus CX23+kamera Optilab, alat bedah (*scapel*, gunting, pinset, jarum pentul), kapas, toples, labu ukur volume 10 ml, kulkas, kaca objek dan sarung tangan.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur BALB/c berumur 6-8 minggu dengan berat badan 20-40 g, aquades, larutan formalin 10%, simplisia Daun Afrika, NaCl 0,9%, alkohol 70%, sekam, pakan ayam CP 511, air ledeng, eter, xylol, parafin, hematoxylin eosine 1% dan Basam Canada.

### **3.3 Rancangan Percobaan**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap (RAL) menggunakan 4 kelompok perlakuan dan 3 kali ulangan. Perlakuan yang diberikan adalah:

K : Aquades

P1: Infusa Daun Afrika 10% b/v

P2: Infusa Daun Afrika 20% b/v

P3: Infusa Daun Afrika 30% b/v

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah infusa Daun Afrika dengan konsentrasi 10% b/v, 20% b/v dan 30% b/v. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah histopatologi ginjal mencit galur BALB/c. Adapun variabel kontrol dalam penelitian ini adalah jenis hewan uji, jenis kelamin, umur, bobot, kondisi perawatan, kualitas makanan dan minuman yang diberikan.

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur BALB/c. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur BALB/c sebanyak 12 ekor, berumur 6-8 minggu dengan berat badan 20-40 gam.

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Pembuatan simplisia dan Determinasi Tanaman**

Pembuatan simplisia dan determinasi tanaman dilakukan di Materia Medika, Batu, Malang yang dapat dilihat pada lampiran 2.

#### **3.4.2 Pembuatan Infusa Daun Afrika**

Simplisia Daun Afrika yang telah dideterminasi dihaluskan dan dipanaskan dengan 100 ml aquades pada suhu 90 selama 15 menit sesuai dengan dosis yang dibutuhkan pada setiap konsentrasi yang diuji. Kemudian sampel disaring menggunakan kain flanel sampai volume 100 ml aquades.

### **3.4.3 Persiapan Hewan uji**

Mencit jantan galur BALB/c diambil dari PUSVETMA Surabaya yang kemudian diperlakukan sesuai dengan kode etik yang berlaku (lampiran 1). Mencit diaklimatisasi dahulu sebelum dilakukan perlakuan selama 5 hari dengan tujuan mencit menyesuaikan diri dengan lingkungan dan tidak stress. Aklimatisasi dilakukan ketika akan diberikan perlakuan, sehingga setelah proses aklimatisasi ini diharapkan mencit dalam kondisi stabil.

### **3.4.4 Perlakuan**

Berat badan mencit ditimbang setiap hari untuk mengetahui perbedaan perilaku mencit secara signifikan. Perlakuan dilakukan secara oral menggunakan spuit yang ujungnya diberi kanul dengan volume 0,25 ml selama 28 hari.

### **3.4.5 Pembuatan Sediaan Preparat Ginjal**

Hewan uji yang akan dibedah dikorbankan yakni dengan cara memasukkan mencit ke dalam wadah tertutup berisi eter. Mencit yang telah dibedah kemudian diambil organ ginjal dengan menggunakan pinset dan gunting bedah. Hewan uji yang telah dibedah, dimasukkan ke dalam kantong plastik hitam dan dikubur. Kemudian ginjal dicuci dengan NaCl 0,9% dan dimasukkan ke dalam pot formalin 10% untuk diawetkan.

Tahap pertama proses pembuatan preparat adalah ginjal difiksasi dalam larutan formalin 10% selanjutnya dimasukkan dalam alkohol 30% selama 20 menit dengan 3 kali ulangan. Kemudian dilanjutkan untuk dimasukkan ke dalam alkohol 40%, alkohol 50%, alkohol 60%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 96% selama 1 jam. Ginjal kemudian dimasukkan larutan xylol alkohol 1:1 dengan waktu  $\pm 24$  jam, kemudian ke dalam larutan xylol sebanyak 3 kali dengan waktu masing-masing 20 menit sehingga jaringan terlihat tembus pandang. Kemudian dimasukkan dalam xylol parafin 1:1

selama 20 menit dengan dipanaskan dalam oven 60. Embeding dan bloking paraffin sebanyak 3 kali selama 20 menit, kemudian dicetak blok paraffin dan didinginkan.

Tahap selanjutnya adalah pemotongan blok. Blok yang sudah disiapkan dipotong dengan ketebalan 5 mikron, kemudian dimasukkan air panas±60 Setelah irisan mengembang, kemudian diambil menggunakan kaca objek, yang sudah diberi albumin, lalu dikeringkan. Parafin yang ada di sekitar objek dihilangkan dengan dipanaskan dalam oven 60 atau dengan tungku. Tahap terakhir adalah pewarnaan. Pewarnaan dilakukan dengan xylol sebanyak 3 kali, masing-masing selama 10 menit. Kemudian, dilakukan rehidrasi dengan alkohol xylol (alkohol 96%+xylol) selama 5 menit. Dichelupkan dalam alkohol 80%-70%-60%-50%-40%-30%, masing-masing selama 30 menit. Dibilas dengan alkohol 30%-96% masing-masing±30 menit dan aquades 1 kali±10 menit. Irisan direndam dalam hematoksilin±10 menit kemudian dibilas dengan air mengalir sampai bersih. Bilas aquades kemudian acid alkohol (alkohol+NaCl 0,9%), kemudian alkohol 50-96%, eosin±2-5 menit kemudian alkohol 96% sebanyak 2 kali dan alkohol xylol. Hasilnya dikeringkan dengan kertas saring, kemudian dibersihkan kotoran-kotoran yang ada di sekitar jaringan. Tahap selanjutnya irisan dimasukkan xylol sebanyak 2 kali selama 5 menit, kemudian ditetesi Balsam Canada dan langsung ditutup dengan kaca penutup.

#### **3.4.6 Pengamatan Preparat Histopatologi Ginjal**

Pengamatan dilakukan pada 4 lapang pandang (LP) dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 200 kali di bagian korteks ginjal. Sasaran pembacaan preparat adalah sel ginjal yang mengalami perubahan histopatologi berupa kongesti dan hemorragi. Kemudian hasil pengamatan akan dimasukkan dalam tabel skoring menurut Banff, 1997.

## Kongesti

- 1 = bila dalam satu LP tidak ditemukan pembuluh darah yang dilatasi dan berisi eritrosit.
- 2 = bila dalam satu LP ditemukan satu pembuluh darah yang dilatasi dan berisi eritrosit.
- 3 = bila dalam satu LP ditemukan dua pembuluh darah yang dilatasi dan berisi eritrosit.
- 4 = bila dalam satu LP ditemukan tiga pembuluh darah yang dilatasi dan berisi eritrosit.

## Hemorragi

- 1 = bila dalam satu LP tidak ditemukan eritrosit pada jaringan interstitial.
- 2 = bila dalam satu LP ditemukan sedikit eritrosit dalam jaringan interstitial (-25% LP).
- 3 = bila dalam satu LP ditemukan eritrosit sedang dalam jaringan interstitial (<50% LP).
- 4 = bila dalam satu LP ditemukan banyak eritrosit menyebar pada interstitial (>50%).

### 3.5 Analisis Data

Hasil pemeriksaan mikroskopik berupa data skoring. Data hasil penelitian ditabulasi, selanjutnya perubahan yang ditemukan dianalisis menggunakan uji Kruskal Wallis dengan taraf kepercayaan 95%. Program statistik yang digunakan untuk analisis adalah SPSS 16.