

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menguji antioksidan dari rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc.) terhadap kerusakan ginjal tikus terpapar zat *allethrin* dari obat antinyamuk. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Perlakuan yang digunakan kontrol (tanpa perlakuan) dan tikus yang diberi ekstrak rimpang jahe dengan 5 dosis yang berbeda.

3.2 Variabel Penelitian

Dalam penelitian terdapat tiga variabel yaitu variabel bebas, variabel terikat, variabel terkendali. Pada variabel bebas adalah pemberian ekstrak rimpang jahe dengan lima dosis yang berbeda dengan cara mencekakkan yaitu 100 mg/kg bb/hari, 125 mg/kg bb/hari, 150 mg/kg bb/hari, 175 mg/kg bb/hari dan 200 mg/kg bb/hari. Variabel terikat yaitu jumlah sel nekrosis pada glomerulus dan tubulus ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang terpapar oleh zat *allethrin* dari obat antinyamuk elektrik. Variabel terkendali yaitu jenis tikus yang digunakan merupakan tikus jantan yang terpapar dengan zat *allethrin* dari obat antinyamuk elektrik.

3.3 Tempat dan Waktu

Penelitian pemberian ekstrak rimpang jahe terhadap gambaran histologi ginjal tikus terpapar zat *allethrin* dari obat antinyamuk dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan mei - juli 2010.

3.4 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvergicus*) yang diperoleh dari UPHP (Unit Pengembangan Hewan Coba) UGM Yogyakarta dengan kriteria umur 2-3 bulan, berat badan 150-200 gram dan jenis kelamin jantan

Perkiraan besar sampel yang digunakan adalah 28 ekor tikus putih (*Rattus norvergicus*), yang dibagi menjadi 7 kelompok perlakuan setiap kelompok perlakuan terdiri 4 ekor tikus sebagai ulangan.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: kandang tikus, tempat pakan tikus, tempat minum tikus, media antinyamuk elektrik, alat pencekok syring (jarum gavage), gelas ukur, seperangkat alat bedah, pipet tetes, timbangan, rotary evaporator, kaos tangan, papan bedah, analitik dan mikroskop (mikroskop komputer).

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: hewan coba tikus putih, bubuk jahe merah (*Zingiber officinale Rosc*) yang diperoleh dari Balai Materia Medika Kota Batu, methanol, Na CMC, zat *allethrin* dari obat antinyamuk, kloroform 90 %, formalin 10% dan alkohol 70%, pakan tikus BR 1, dan air aquades.

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dilakukan, tikus terlebih dahulu di aklimatisasi selama dua minggu pada kondisi laboratorium. Selama aklimatisasi tikus diberi pakan pellet dan diberi minum air yang berasal dari PDAM. Mempersiapkan tempat pemeliharaan hewan coba yang meliputi kandang, sekam, tempat makan dan minum tikus, serta pakan tikus.

3.6.2 Persiapan Perlakuan

3.6.2.1 Pembagian Kelompok Sampel

Penelitian ini menggunakan 7 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor mencit kelompok perlakuan dibagi sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol negatif : tikus tanpa pemberian perlakuan paparan zat *allethrin* dari obat antinyamuk dan tanpa pemberian ekstrak rimpang jahe

2. Kelompok kontrol positif : tikus dengan pemberian perlakuan paparan zat *allethrin* dari obat antinyamuk dan tanpa pemberian ekstrak rimpang jahe
3. Kelompok I : tikus dengan pemberian perlakuan paparan zat *allethrin* dari obat antinyamuk selama 8 jam/hari dan pemberian ekstrak rimpang jahe dosis I selama 45 hari
4. Kelompok II: tikus dengan pemberian perlakuan paparan zat *allethrin* dari obat antinyamuk selama 8 jam/hari dan pemberian ekstrak rimpang jahe dosis II selama 45 hari
5. Kelompok III : tikus dengan pemberian perlakuan paparan zat *allethrin* dari obat antinyamuk selama 8 jam/hari dan pemberian ekstrak rimpang jahe dosis III selama 45 hari
6. Kelompok IV : tikus dengan pemberian perlakuan paparan zat *allethrin* dari obat antinyamuk selama 8 jam/hari dan pemberian ekstrak rimpang jahe dosis IV selama 45 hari
7. Kelompok V : tikus dengan pemberian perlakuan paparan zat *allethrin* dari obat antinyamuk selama 8 jam/hari dan pemberian ekstrak rimpang jahe dosis V selama 45 hari

3.6.2.2 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc) dilakukan melalui tahapan sebagai berikut :

1. Serbuk rimpang jahe 100 gram yang telah halus dimaserasi dengan pelarut metanol 300 ml selama 24 jam sambil sesekali diaduk
2. Serbuk yang telah dimaserasi disaring dengan corong bunchner
3. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental
4. Ekstrak kental yang dihasilkan selanjutnya disimpan dan digunakan untuk perlakuan

3.6.3 Kegiatan Penelitian

3.6.3.1 Perlakuan Paparan Zat Allethrin

Allethrin diperoleh dari kandungan bahan aktif obat anti nyamuk elektrik, dengan lama pemberian 8 jam/ hari selama 45 hari (Sarivastava *et al*, 2006). Pemaparan dilakukan dengan memberikan obat nyamuk elektrik pada masing-masing kandang tikus perlakuan.

3.6.3.2 Perlakuan Pemberian Ekstrak Jahe

Ekstrak bubuk jahe yang telah diekstraksi ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik sebanyak 100 g, 125g, 150 g, 175g, 200 g, kemudian dicekokkan kepada masing-masing kelompok tikus yaitu kelompok I, II, III, IV, VI, dan VII setiap hari selama 45 hari. Perlakuan pencekokan jahe diberikan setelah perlakuan penginduksian zat *allethrin*. Hal ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jumlah sel

nekrosis pada jaringan glomerulus dan tubulus tikus secara signifikan setelah dipaparkan zat *Allethrin*.

3.6.3.3 Pengambilan Sampel

Pembedahan dilakukan setelah 45 hari perlakuan dengan langkah sebagai berikut:

1. Hewan coba dianastesi secara inhalasi dengan menggunakan klorofom
2. Dilakukan pembedahan secara vertical dari daerah abdomen posterior menuju anterior dengan membuka daerah rongga perut dan rongga dada.
3. Diambil ginjal sebelah kanan dan sebelah kiri difiksasi dalam larutan formalin 10%
4. Hasil yang diperoleh kemudian dikelompokkan berdasarkan kelompok penelitian

3.6.3.4 Pembuatan Preparat Histologi Ginjal

Pembuatan preparat histologi ginjal dilakukan dengan langkah sebagai berikut:

1. Tahap fiksasi

Pada tahap ini, ginjal difiksasi pada larutan formalin 10% selama 1 jam, diulang sebanyak 2 kali pada larutan yang berbeda

2. Tahap dehidrasi

Ginjal yang telah difiksasi kemudian didehidrasi pada larutan etanol 70% selama 1 jam, kemudian dipindahkan dalam larutan etanol 80%, dilanjutkan kedalam larutan etanol 95% sebanyak 2 kali dan dalam etanol absolute yang berbeda

3. Tahap clearing (penjernihan)

ginjal yang telah didehidrasi kemudian diclearing untuk menarik kadar etanol dengan menggunakan larutan xylene I selama 1,5 jam dan dilanjutkan ke larutan xylene II selama 1,5 jam

4. Tahap embedding

Pada tahapan ini, ginjal dimasukkan kedalam kaset dan diinfiltrasikan dengan menggunakan paraffin yang dicairkan pada suhu 60°C, kemudian paraffin dibiarkan mengeras dan dimasukkan ke dalam freezer selama ± 1 jam.

5. Tahap sectioning (pemotongan)

Ginjal yang sudah mengeras dilepaskan dari kaset dan dipasang pada mikrotom kemudian dipotong setebal 5 micron dengan pisau mikrotom. Hasil potongan dimasukkan ke dalam water bath bersuhu 40°C untuk merentangkan hasil potongan, hasil potongan kemudian diambil dengan object glass dengan posisi tegak lurus dan dikeringkan

6. Tahap staining (pewarnaan)

Hasil potongan diwarnai dengan hemotoxilin eosin (pewarnaan HE) melalui tahapan sebagai berikut :

- a. Preparat direndam dalam larutan xylene I selama 10 menit
- b. Preparat diambil dari xylene I dan direndam dalam larutan xylene II selama 5 menit
- c. Preparat diambil dari xylene II dan direndam dalam ethanol absolute selama 5 menit
- d. Preparat diambil dari ethanol absolute dan direndam dalam ethanol 96 % selama 30 detik
- e. Preparat diambil dari ethanol 96 % dan direndam dalam ethanol 50% selama 30 detik
- f. Preparat diambil dari ethanol 50% dan direndam dalam larutan running tap water selama 5 menit
- g. Preparat diambil dari running tap water dan direndam dalam meyer hematoshirin selama 1-5 menit
- h. Preparat diambil dari larutan meyer dan direndam dalam running tap water selama 2-3 menit
- i. Preparat diambil dari running tap water dan direndam dalam pewarna eosin selama 1-5 menit

- j. Preparat diambil dari larutan eosin kemudian dimasukkan ke dalam ethanol absolute selama 5 detik diulang 3 kali pada ethanol absolute yang berbeda
- k. Preparat diambil dan direndam dalam xylene III selama 5 menit, kemudian dipindahkan dalam xylene IV selama 5 menit dan terakhir dipindahkan ke dalam xylene V selama 10 menit
- l. Preparat diangkat dan dikeringkan
- m. Preparat ditutup menggunakan deckglass.

3.7 Teknik Pengambilan Data

Preparat histologi ginjal diperiksa di bawah mikroskop cahaya pembesaran 40x untuk mendapatkan sel nekrosis yang jelas. Perhitungan dilakukan oleh peneliti dengan pengulangan 4 kali setiap preparat. Pengambilan data dengan prosentase.

Sel nekrosis secara mikroskopik akan nampak terjadi perubahan inti yaitu hilangnya gambaran kromatin, inti menjadi kriptik, tidak vakuoler lagi, inti tampak lebih padat, warnanya gelap hitam, inti terbagi atas fragmen-fragmen, atau robek (Himawan, 1992) dalam Suhenti (2007).

3.8 Tabel Pengamatan

Data hasil pengamatan histologis ginjal tikus ditandai dengan adanya nekrosis sel glomerulus dan tubulus. Untuk tiap kelompok perlakuan disajikan dalam bentuk tabel sebagai berikut:

Perlakuan	Nekrosis sel glomerulus			
	Ulangan			
Kontrol (-)	I	II	III	IV
Kontrol (+)				
Dosis I				
Dosis II				
Dosis III				
Dosis IV				
Dosis V				

Perlakuan	Nekrosis sel tubulus			
	Ulangan			
Kontrol (-)	I	II	III	IV
Kontrol (+)				
Dosis I				
Dosis II				
Dosis III				
Dosis IV				
Dosis V				

3.9 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak jahe terhadap jumlah sel nekrosis pada glomerulus dan tubulus ginjal, maka data dianalisis menggunakan

analisis ANAVA satu arah. Apabila dari hasil analisis diperoleh nilai $F_{hitung} \geq F_{tabel}$ 0,01 dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf signifikan 0,01.

