

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, Laboratorium PADIA Surabaya, dan Laboratorium Terintegritas Fakultas Kesehatan Muhammadiyah Sidoarjo. Waktu penelitian berlangsung pada bulan April 2023.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat dalam penelitian ini meliputi kandang tikus, wadah pakan dan minum, timbangan, perlengkapan bedah, *gloves*, botol spesimen, *rotary vacuum evaporator*, *oral sonde*, *embedding disc*, mikrotom, penangas air, kertas saring, *object glass*, *cover glass*, mikroskop dan oven.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam pengujian antara lain; daun teh hijau (*Camellia sinensis*), pewarna *Haematoksin Eosin (HE)*, *xylol*, *Neutral Buffered Formalin (NBF)* 10%, alkohol bertingkat (70%,80%,90%,96% dan 100%), etanol 96%, parafin, *aquadest*, *enthelan*, air, pakan ayam dan tikus putih *Rattus norvegicus* jantan.

3.2.3 Hewan Percobaan

Hewan uji yang digunakan yaitu tikus putih *Rattus norvegicus*. Tikus putih diperlukan sebanyak 24 ekor dengan berat antara 150-200 gram. Sebelum diberikan perlakuan hewan uji dilakukan aklimatisasi selama tujuh hari guna meminimalisir stres, kemudian dilakukan pemberian perlakuan uji selama empat

belas hari. Hewan uji yang digunakan harus dalam kondisi sehat dan tidak menunjukkan gejala sakit, berumur antara 8-12 minggu dan variasi berat badan antar hewan uji tidak lebih dari 20% dari rata-rata berat badan (BPOM, 2014).

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian merupakan penelitian eksperimental dengan metode rancangan acak lengkap (RAL). Hewan uji yang digunakan berkelamin jantan dengan *random sampling* sebagai teknik pengambilan sampel. Penelitian menggunakan empat perlakuan dan enam ulangan dengan perhitungan menggunakan rumus frederer sebagai berikut:

$$(t-1)(n-1) \geq 15 \quad \text{Keterangan :}$$

$$(4-1)(n-1) \geq 15 \quad t = \text{Perlakuan}$$

$$3n-3 \geq 15 \quad n = \text{Ulangan}$$

$$3n \geq 15+3$$

$$n \geq 18:3$$

$$n \geq 6$$

$$n = 6$$

Jumlah tikus putih yang digunakan adalah:

$$N = n \times t$$

$$= 6 \times 4$$

$$N = 24$$

Sehingga, penelitian ini menggunakan tikus putih sebanyak 24 ekor.

3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dikelompokkan menjadi tiga, terdiri dari

variabel bebas, variabel kendali dan variabel terikat:

- a. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu ekstrak daun teh yang diberikan secara peroral kepada tikus putih *Rattus norvegicus* dengan dosis yang berbeda serta waktu pemaparan.
- b. Variabel kendali pada penelitian ini yaitu ras, pakan, jenis kelamin (jantan), dan makanan untuk tikus.
- c. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu gambaran histopatologi ginjal tikus yang diinduksi pemberian dosis ekstrak daun teh (*Camellia sinensis*).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan uji didapat dari Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Masing-masing hewan uji dipindahkan sesuai dengan kelompok perlakuan. Kandang tikus dibuat menggunakan *litter box* dengan diberi kawat sebagai tutup, sedang serbuk gergaji dipilih sebagai alas kandang. Setiap kandang diberikan pakan dan minum secara *ad libitum*. Struktur kandang memiliki sirkulasi baik sehingga suhu udara mengikuti suhu ruangan serta cahaya dapat masuk secara terkontrol dengan siklus 12 jam siang dan 12 jam malam. Dilakukan aklimatisasi selama tujuh hari pada hewan uji agar dapat beradaptasi dengan lingkungan baru dan menghindarkan stres.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*)

Metode maserasi dipilih sebagai metode pembuatan ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang mengacu pada Diantika, dkk. (2014). Diperlukan daun teh hijau kering sebanyak 1 kg, campur dengan pelarut etanol 96% dengan rasio 1:3

antara bahan dan pelarut. Untuk memisahkan rafinat dan larutan ekstrak, saring bahan menggunakan kain saring, sedangkan untuk memisahkan larutan dari pelarutnya digunakan *rotary vacuum evaporator* (evaporasi) dengan suhu 70 °C, ±50 rpm selama ±45 menit. Dilanjutkan dengan proses pengeringan menggunakan oven selama 24 jam dengan suhu 60 °C, sehingga dihasilkan ekstrak.

3.4.3 Pemberian Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) Pada Tikus

Pemberian ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*) dilakukan melalui *peroral*, dengan langkah pertama melakukan pengenceran ekstrak dengan mencampur *aquadest* secukupnya. Menurut anjuran BPOM (2014), dosis yang dipergunakan adalah P1 (50 mg/kg BB), P2 (500 mg/kg BB), dan P3 (5000 mg/kg BB). Dengan perhitungan dosis sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Perlakuan 1} &= 50 \text{ mg/kg BB} \times 200 \text{ g} \\ &= 50 \text{ mg/kg BB} \times 0,2 \text{ kg} \\ &= 10 \text{ mg} = 0,01 \text{ g} = 0,01 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Perlakuan 2} &= 500 \text{ mg/kg BB} \times 200 \text{ g} \\ &= 500 \text{ mg/kg BB} \times 0,2 \text{ kg} \\ &= 100 \text{ mg} = 0,1 \text{ g} = 0,1 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Perlakuan 3} &= 5000 \text{ mg/kg BB} \times 200 \text{ g} \\ &= 5000 \text{ mg/kg BB} \times 0,2 \text{ kg} \\ &= 1000 \text{ mg} = 1 \text{ g} = 1 \text{ ml} \end{aligned}$$

Dosis yang diberikan pada hewan uji sebesar:

- a. Kelompok perlakuan P0: Tikus sebagai pembanding tanpa perlakuan hanya dibelikan 1 ml *aquadest* secara *peroral*.

- b. Kelompok perlakuan P1: Kelompok perlakuan tikus diberi dosis ekstrak daun teh hijau sebanyak 0,01 ml dan ditambahkan *aquadest* hingga menjadi 1 ml secara peroral/ ekor.
- c. Kelompok perlakuan P2: Kelompok perlakuan tikus diberi dosis ekstrak daun teh hijau sebanyak 0,1 ml dan ditambahkan *aquadest* hingga menjadi 1 ml secara peroral/ ekor.
- d. Kelompok perlakuan P3: Kelompok perlakuan tikus diberi dosis ekstrak daun teh hijau sebanyak 1 ml tanpa *aquadest* secara peroral/ ekor.

3.4.4 Prosedur Pelaksanaan

Hewan uji sebanyak 24 ekor ditempatkan pada empat kelompok perlakuan antara lain:

P0 = tanpa perlakuan (hanya pemberian pakan dan minum)

P1 = diberi ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) 10 mg/kg BB/tikus;

P2 = diberi ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) 100mg/kg BB/tikus;

P3 = diberi ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) 1000mg/kg BB/tikus.

Hewan wajib dipuasakan selama 14-48 jam sebelum diberi perlakuan (BPOM, 2014). Dilakukan penimbangan hewan sebelum diberikan sediaan uji. Sediaan uji diberikan melalui rute *oral* dengan bantuan sonde *oral*, sediaan diberikan dengan dosis tunggal. Hewan uji dapat kembali diberi makan 3-4 jam setelah perlakuan.

3.4.5 Teknik Pengambilan Sampel

Hewan uji yang telah diberikan ekstrak daun teh hijau selama 14 hari dilakukan euthanasi dengan metode *servical bone dislocation* dengan cara

memisahkan tengkorak otak dari sumsum tulang belakang, caranya tikus akan diletakkan pada bidang datar setelah itu, satu tangan memegang alat seperti gunting yang diletakkan dibagian leher tikus dan satu tangan yang lain memegang ekor tikus, setelah itu tekan alat yang digunakan untuk menekan leher tikus dan Tarik ekor yang dipegang oleh tangan lainnya sampai tikus mengeluarkan suara dan sampai tikus tidak bergerak lagi atau mati. Kelebihan dari euthanasia ini adalah tidak perlu obat bius, lebih ekonomis, dan hasil lebih terjamin (Cheng, 2021).

Dilakukan pembedahan laparatomi untuk mengambil organ ginjal hewan uji, ginjal kemudian difiksasi kedalam larutan *Neutral Buffered Formalin* (NBF) 10%. Pembacaan preparat histopatologi dilakukan melalui mikroskop dan dengan pewarnaan HE (Widodo, 2018).

3.4.6 Preparasi Sampel Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi mengacu pada Suhita, dkk. (2013), yaitu tahap pertama ginjal difiksasi ke dalam larutan *Neutral Buffered Formalin* (NBF) 10% selanjutnya dipotong dan dimasukkan dalam wadah pot spesimen. Tahap kedua, proses dehidrasi dengan alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 100% I dan 100% II) selama 2 jam. Tahap ketiga, dilakukan penjernihan dengan xylol. Tahap keempat, pembuatan blok parafin dengan menuangkan parafin ke dalam cetakan dan disimpan pada lemari es.

Tahap kelima, blok-blok parafin yang telah terbentuk kemudian dipotong dengan mikrotom setebal 5-6 μm . Tahap keenam, potongan blok parafin kemudian diapungkan dalam air hangat selama 24 jam bersuhu 60 °C. Setelah perendaman sediaan diangkat dan diletakan dalam *object glass* untuk pewarnaan HE.

Proses pewarnaan HE kali ini mengacu pada Widodo (2018) diawali dengan deparafinasi menggunakan xylol dan rehidrasi dengan alkohol bertingkat. Dilanjutkan dengan perendaman dalam xylol selama 24 jam sebagai proses penjernihan. Angkat jaringan dan tetesi dengan *enthelan* sebelum ditutup dengan *cover glass (mounting)*.

3.4.7 Pembacaan Sampel Histopatologi

Pembacaan histopatologi dilakukan dengan menggunakan pembesaran 400x pada mikroskop di Laboratorium Sitohistoteknologi dan Hewan Coba Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo.

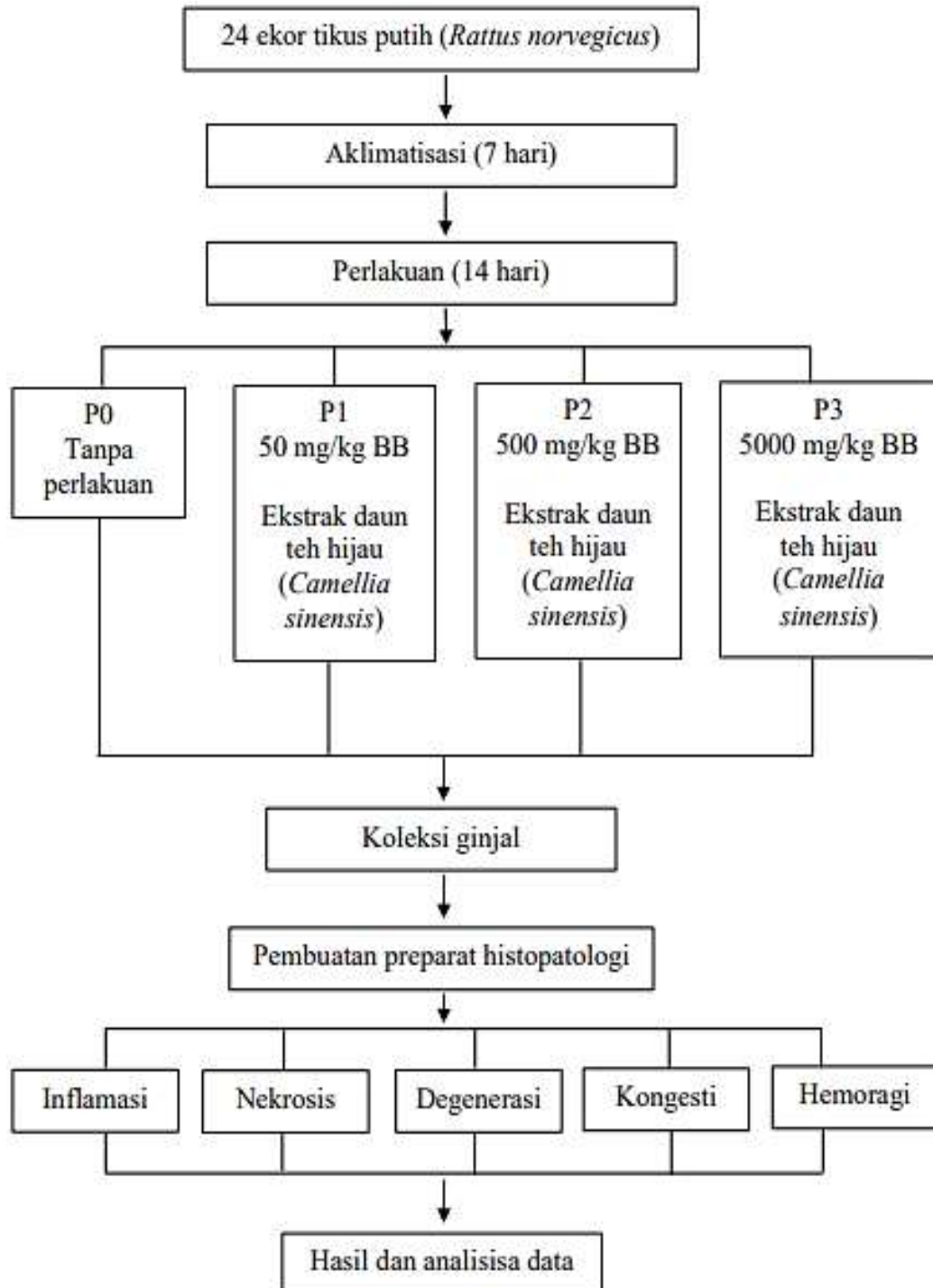
3.4.8 Skoring Histopatologi Uji Toksisitas Akut Ginjal

Skoring histopatologi yang akan diamati terdiri dari inflamasi, degenerasi, hemoragi, dan nekrosis pada sel. Penilaian akan dilakukan menggunakan penilaian semi kuantitatif yang akan dibagi ke dalam 5 kategori mulai dari 0 (tidak ada perubahan), 1 (minimal), 2 (mild), 3 (moderate), 4 (severe) (Gibson-Corley et al., 2013).

Tabel 1.1 Tabel skoring.

Tingkat Perubahan	Nilai
Tidak Ada Perubahan (TAP)	0
1%-25% sel mengalami perubahan	1
26%-50% sel mengalami perubahan	2
51%-75% sel mengalami perubahan	3
76%-100% sel mengalami perubahan	4

3.4.9 Kerangka Penelitian



3.5 Analisa Data

Data hasil pengamatan histopatologi ginjal berjenis data semi kuantitatif dengan skoring sesuai parameter yang telah ditetapkan. Data hasil pengamatan selanjutnya dilakukan analisa secara deskriptif. Data pengamatan histopatologi uji toksisitas akut dianalisa menggunakan *Kruskal-Wallis* untuk perbandingan antar perlakuan dari setiap sampel. Dilanjut dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan saat ditemukan hasil yang berbeda nyata.