

III. MATERI DAN METODE

1.1. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan dan Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Lama penelitian ini berlangsung selama bulan September - Desember 2023.

1.2. Materi Penelitian

1.2.1. Bahan

Sampel bahan uji yang termasuk penelitian Bahan sampel uji dalam penelitian ini adalah foto slide organ testis mencit (*Mus musculus*) galur BALB/c jantan, daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) 1kg, larutan etanol 96%, dan CMC-Na 1%. larutan buffer neutral formalin 10% (BNF), alkohol, ketamin, *xylol*, parafin cair, mayer haematoxyline, eosin, permount, lithium carbonate dan H₂O, dan aquadest.

3.2.2. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan tissue processor, tissue-tek tech, tissue casset, scalpel, blade, pot sampel, pinset, cool box, pensil, bolpoint, label, cetakan blok, rak object glass, mikrotom, inkubator, water bath, object glass, cover, kapas, kertas saring, rotary evaporator, glas mikroskop, botol kosong, kompor dan mortar stempel.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen nyata (RAL) dengan rancangan acak lengkap. Selain itu, sampel diambil dengan tiga perlakuan acak.

3.3.2 Variabel Penelitian

Variable dari penelitian ini terdiri dari beberapa, yaitu :

- a. Variabel bebas adalah variabel yang harus diubah atau dimanipulasi oleh peneliti agar hasilnya dapat diketahui terhadap obyek yang ingin diteliti.
- b. Ekstrak daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) dosis 300kg/BB, 2000kg/BB, 5000kg/BB salah satu dari variable bebas yang dilakukan pada penelitian ini.
- c. Variabel terikat adalah hasil yang tidak menentu dari perubahan variable bebas. Hasil dari pemberian ekstrak daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) terhadap organ testis (nekrosis, infiltrasi sel radang, dandegenerasi melemak) ini adalah varibel terikat.
- d. Variabel terkendali yaitu variabel data penelitian yang berpengaruh tetapi dapat dikendalikan. Misalnya, berat badan, usia dan jenis kelamin mencit (*Mus musculus*).

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Pembuatan Ekstrak Daun Kembang Bulan

Daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) dalam keadaan kering yang ingin di ekstrak dengan banyak 1 kg. Selanjutnya diubah menjadi serbuk dengan cara penggilingan. Selanjutnya perendaman (maserasi) untuk menjadi larut dengan penambahan larutan etanol 96%.

Prosedur pencampuran ini harus diulangi beberapa kali hingga mendapatkan hasil larutan yang lebih jernih. Bahan yang dipakai untuk menyaring larutan maserasi adalah kapas dan kertas sari. Ketika tidak ada lagi etanol, filtrat yang dihasilkan dikumpulkan dan dikentalkan dalam rotary evaporator yang dilengkapi dengan penangas udara, pompa vakum, dan suhu vakum 60 °C. Ekstrak daun kembang bulan dikumpulkan, diencerkan dengan CMC-Na 1 persen, kemudian diberikan pada mencit sesuai dengan rencana perlakuan.

3.4.2 Perlakuan Ekstrak Daun Kembang Bulan Pada Mencit

Ekstrak daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) diberikan secara peroral pada mencit. Pertama, dimulai dengan sonde yang ujungnya terbuat dari karet untuk pengambilan ekstrak. Menurut Sasmita (2017), volume cairan maksimal yang dapat diberikaan peroral pada mencit adalah 1 ml.

Dalam penelitian ini digunakan dosis yang akan diberikan pada setiap mencit adalah P1 dengan 300 mg/kg BB, P2 dengan 2000 mg/kg BB, dan P3 dengan 5000 mg/kg BB, single dose.

Perhitungan dosis

Dosis Mencit P1= $0.025 \times 300\text{mg} = 7.5 \text{ mg/kgBB}$ mencit Dosis Mencit P2

$$= 0.025 \times 2000 \text{ mg} = 50 \text{ mg/kgBB mencit}$$

$$\text{Dosis Mencit P3} = 0.025 \times 5000 \text{ mg}$$

$$= 125 \text{ mg/kgBB mencit}$$

Maka dosis yang diberikan kepada mencit yaitu

- a. Dosis untuk tiap mencit kelompok P1 adalah 7.5 mg/ 25gBB
- b. Dosis untuk tiap mencit kelompok P2 adalah 50 mg/ 25gBB
- c. Dosis untuk tiap mencit kelompok P3 adalah 125 mg/ 25gBB

Berdasarkan pada volume normal lambung mencit yang disarankan yaitu 1 ml. Yang akan terjadi jika melebihi volume, lambung mengalami dilatasi secara akut yang dapat merobek saluran cerna.

3.4.3 Prosedur Perlakuan

Sebanyak 24 ekor mencit kurang lenih berusia satu sampai tiga bulan dan berat badan 20-30 gram, yang dibagikan dalam 3 kelompok perlakuan sebagai berikut:

P1= Diberikan dosis ekstrak daun kembang bulan 300 mg/kgBB per mencit

P2= Diberikan dosis ekstrak daun kembang bulan 2000 mg/kgBB per mencit.

P3= Diberikan dosis ekstrak daun kembang bulan 5000 mg/kgBB per tikus

Besar sampel dihitung berdasarkan rumus anova yaitu :

$$DF = N - k = kn - k = k(n - 1)$$

Dimana, dapat diperoleh N merupakan hasil total sampel penelitian, k diperoleh dari jumlah kelompok percobaan dan n adalah jumlah sampel per kelompok, kemudian didapatkan hasil dari rumus tersebut yaitu :

$$N = DF/k + 1$$

Keterangan :

N = jumlah sampel tiap kelompok.

k = jumlah kelompok percobaan pada penelitian.

DF = jumlah sampel minimum dan maksimum tiap kelompok (nilai kelompok minimum 10 dan kelompok maksimum 20) (Arifin dan Zahiruddin, 2017).

Penelitian ini terdapat tiga kelompok percobaan kemudian dilakukan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Maksimum } n = DF/k + 1$$

$$n = 20/k + 1 \quad n = 20/4 + 1 \quad n = 6$$

Jadi digunakan pada kelompok maksimum setiap kelompoknya ada 6 sampel hewan.

$$\text{Maksimum } N = \text{maksimum } n \times kN = 8 \times 4$$

$$N = 32$$

Jadi, sampel yang digunakan pada kelompok maksimum adalah 32 ekor tikus dari populasi yang ada.

$$\text{Minimum } n = DF/k + 1$$

$$n = 10/k + 1$$

$$n = 10/4 + 1$$

$$= 3,4$$

Jadi yang digunakan untuk penelitian setiap sampel dalam kelompok minimum ada 3 sampel hewan.

$$\text{Minimum } N = \text{minimum } n \times k$$

$$N = 3 \times 4$$

$$N = 12$$

Jadi yang di gunakan pada kelompok minimum ada 12 sampel hewan

3.4.4 Teknik Pengambilan Sampel

Setelah 1x24 jam dari perlakuan, dilakukan eutanasi dengan dislokasi cervicalis. Dilakukan pembedahan kemudian diambil organ testis. Menggunakan Buffer Neutral Formalin (BNF) 10% untuk melakukan fiksasi organ yang diperoleh.

3.4.5 Preparasi Sampel Histopatologis

Setelah sampel organ difiksasi pada BNF 10%, bagian-bagiannya dipotong secara makroskopis, kemudian dimasukkan ke dalam kantong tissue, diberi label, dan direndam kembali dalam larutan BNF 10%. Sampel ini kemudian dimasukkan ke dalam Tissue Processor® selama 18 jam untuk didehidrasi dengan alkohol dengan konsentrasi absolut 70%, 80%, 90%, dan 96%. Selanjutnya, xylol I, II, dan III dibersihkan, dan sampel diembedding dalam paraffin selama 30 menit dalam incubator. Kemudian, sedikit paraffin cair dimasukkan ke dalam piring logam berbentuk L untuk memblokir. Jaringan dimasukkan dengan pinset dengan cepat, dan paraffin dituangkan kembali hingga menutupi cetakan. Setelah selesai proses dalam Tissue Processor® sampel kemudian dicetak dengan bantuan alat Tissue-Tek Tech® setelah itu dilakukan pemotongan kasar dengan mikrotom. Setelah pemotongan kasar

selesai, sampel dimasukkan kedalam lemari es dan didiamkan selama 24 jam. Setelah itu sampel kemudian di potong menggunakan mikrotom dengan ketebalan $3\mu\text{m}$ dan ditaruh pada object glass. Setelah itu sampel yang telah beradadi *object glass* diinkubasi selama satu malam.

3.4.6 Pembacaan Slide

Slide hasil penelitian yang sudah dalam bentuk preparat diperiksa dengan mikroskop dengan perbesaran 400x. selanjut nya Preparat histopatologi difoto kemudian dilakukan pembacaan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan UWKS.

3.4.7 Perhitungan Skoring

Pengamatan perubahan histopatologi (nekrosis, infiltrasi sel radang, dan degenerasi melemak) dilakukan secara deskriptif pada satu potong jaringan (sediaan) dari setiap testis mencit percobaan. Pada setiap sediaan dihitung jumlah perubahan yang ditemukan.

Berdasarkan rasio kerusakan terhadap total lesi yang ada, kerusakan diberi peringkat dari 0 hingga 3 dalam sistem penilaian untuk perubahan histopatologis. Data diperoleh dari gambar histopatologi yang diperiksa di bawah mikroskop cahaya oleh ahli patologi. Lesi yang diamati sesuai dengan parameter yang sedang diselidiki terdiri dari (Jannah, dkk. 2018)

A. Degenerasi melemak

Dikelompokan dalam 5 skala adalah :

- i. Skor 0 : jika tidak ditemukan degenerasi melemak

- ii. Skor 2 : terdapat degenerasi melemak fokal 25% dari semua LP
- iii. Skor 4 : degenerasi melemak ditemukan secara 50% dari seluruh LP
- iv. Skor 6 : degenerasi melemak ditemukan secara difuse 51-75% dari LP
- v. Skor 8 : degenerasi melemak ditemukan >76% dari LP

B. Infiltrasi Sel radang

Dikategoriakan dalam 5 skala antara lain yaitu :

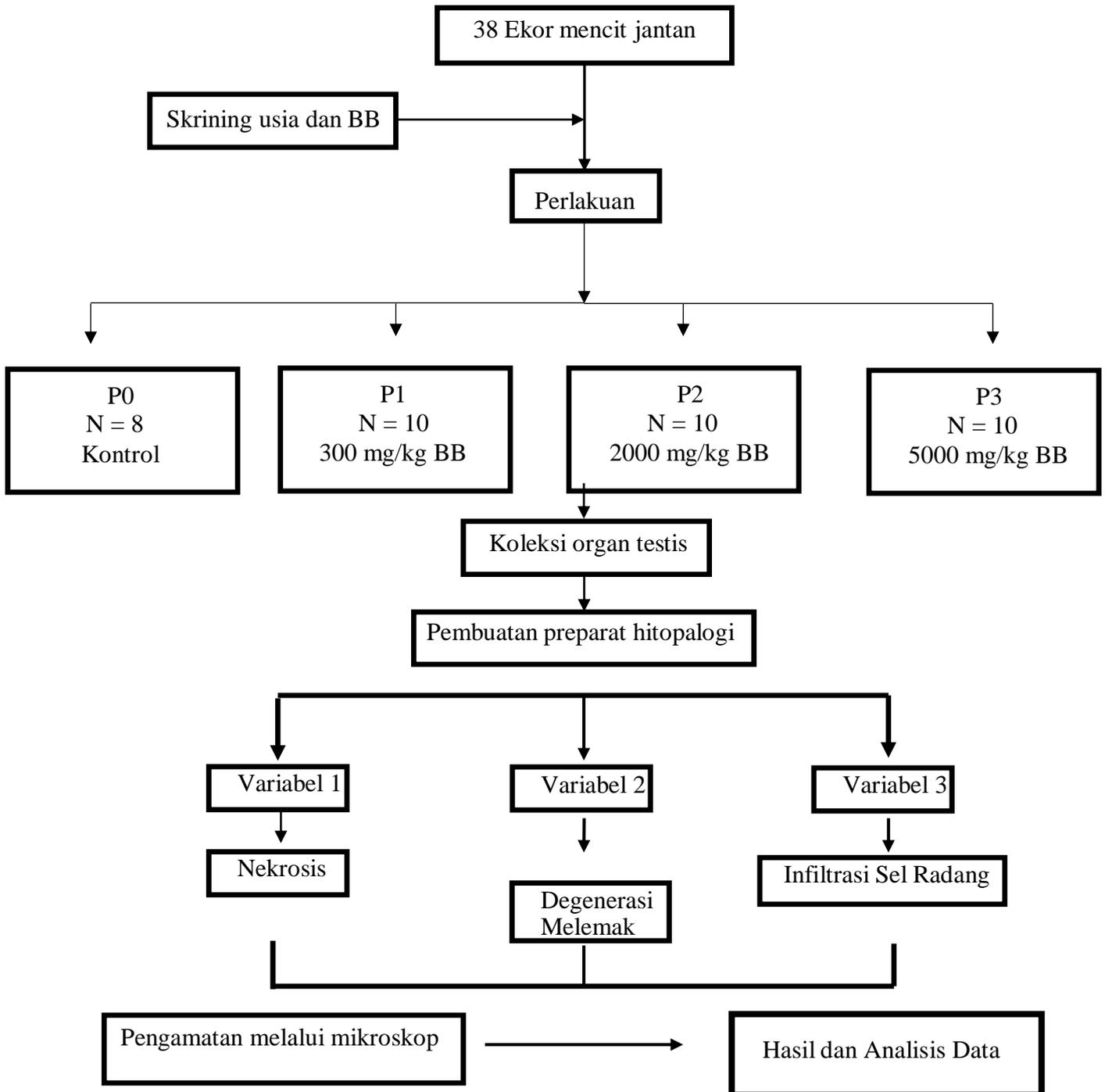
- i. Skor 0 : tidak ditemukannya infiltrasi sel radang.
- ii. Skor 2 : jika jumlah infiltrasi sel radang < 25% dari seluruh LP.
- iii. Skor 4 : infiltrasi sel radang antara 26%-50% dari seluruh LP.
- iv. Skor 6: jika jumlah infiltrasi sel radang antara 51% – 75% dari seluruh LP.
- v. Skor 8: jika jumlah infiltrasi sel radang >76% dari seluruh LP.

C. Nekrosis

Dikumpulkan dalam 5 skala antara lain yaitu :

- i. Skor 0 : tidak terjadi perubahan nekrosis
- ii. Skor 2 : jika jumlah sel nekrosis < 25% dari seluruh LP.
- iii. Skor 4 : jika jumlah sel nekrosis antara 26%-50% dari seluruh LP.
- iv. Skor 6 : jika jumlah sel nekrosis antara 51% – 75% dari seluruh LP.
- v. Skor 8 : jika jumlah sel nekrosis 76% dari seluruh LP.

3.4.8 Kerangka Penelitian



Gambar 8. Kerangka Peneliti

3.4.9 Analisis Data

Data primer adalah data yang dikumpulkan dengan memeriksa histologi testis di bawah mikroskop. Data yang terkumpul akan diberi skor sesuai dengan karakteristiknya untuk mengubahnya dari data kualitatif menjadi kuantitatif. Data non-parametrik digunakan dalam data ini. Untuk membandingkan perlakuan setiap sampel dan pengamatan, uji Kruskal-Wallis digunakan untuk menguji data pengamatan nekrosis, degenerasi melemak, serta infiltrasi sel radang. Uji Man-Whitney kemudian digunakan untuk memastikan perbedaan antara masing-masing perlakuan jika temuan terbukti berbeda secara substansial.