

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan penelitian jenis eksperimental dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL merupakan jenis rancangan percobaan dengan jumlah percobaan harus dapat dikontrol. Rancangan acak lengkap karena pengacakan percobaan dilakukan pada seluruh unit percobaan. Dilakukan jika sampel yang diteliti lebih dari satu (Elvinus *et al*, 2016). Beberapa kelompok perlakuan dengan diberikan secara pengulangan yaitu :

- K : Aquades
- P1 : Infusa daun pepaya 10% b/v
- P2 : Infusa daun pepaya 20 % b/v
- P3 : Infusa daun pepaya 30 % b/v

### 3.2 Populasi dan Sampel

Populasi adalah kumpulan dari keseluruhan elemen yang mempunyai karakteristik umum, terdiri dari banyak bidang untuk diteliti. Sampel adalah sub kelompok dari populasi yang dipilih untuk digunakan pada penelitian (Malhotra, 1996). Populasi yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*), sampel yang digunakan adalah galur BALB/c, penelitian ini menggunakan mencit jantan yang dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok, masing-masing kelompok berisi 6 mencit yang berusia 6-8 minggu dengan bobot tubuh 20-40 gram. Untuk menentukan jumlah kelompok uji menggunakan rumus Federer (Hanafiah, 1997). Sebagai berikut :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Ket :

t = Jumlah kelompok

r = Jumlah subjek perkelompok

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

$$3(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15/3$$

$$r-1 \geq 5$$

$$r \geq 5+1$$

$$r \geq 6$$

Total hewan percobaan sebanyak 24 ekor yang terdiri dari 4 kelompok yang berisi 6 ekor.

### 3.3 Bahan dan Alat yang digunakan

#### A. Bahan

Bahan yang dipakai penelitian ini yaitu mencit jantan galur BALB/c yang berusia 6-8 minggu dengan berat badan 20-40 g.

- Aquadest sebagai air minum dan berfungsi sebagai pelarut infusa.
- Pelet sebagai pakan mencit
- Baki sebagai kandang mencit dan sekam sebagai alas pada kandang.
- Simplisia daun pepaya sebagai bahan pemeriksaan histologi ginjal.
- Alkohol 70 % sebagai pensteril ruangan dan pembersih alat bedah dan preparat ginjal.
- Eter sebagai obat bius sebelum melakukan pembedahan organ pada mencit.
- Xylol sebagai larutan preparat ginjal
- Parafin sebagai larutan preparat ginjal
- Balsam canada sebagai pelapis kaca objek
- NaCl 0,9%
- Neutral Buffer Formalin (NBF) 10%

#### B. Alat

Alat yang dipakai penelitian ini yaitu :

1. Alat pembuatan infusa yaitu :
  - a. Panci lapis enamel.

- b. Termometer.
  - c. Stopwatch.
  - d. Batang pengaduk.
  - e. Kompor.
  - f. Kain flannel.
  - g. Beaker glass.
  - h. Gelas ukur.
2. Alat yang digunakan untuk perlakuan dan pemeriksaan histologi ginjal yaitu :
- a. Seperangkat alat bedah.
  - b. Timbangan.
  - c. Sduit.
  - d. Vial untuk menaruh organ ginjal mencit.

### 3.4 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai dengan Juni 2021, yang telah dilaksanakan pada Laboratorium Farmakologi Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Dan lokasi penelitian dan pembacaan gambaran histopatologi ginjal dilakukan pada Laboratorium Patologi Institut Pertanian Bogor.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu variasi pemberian dosis infusa daun pepaya (*Carica papaya* L.).

#### b. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu mengamati perubahan histopatologi organ ginjal akibat pemberian infusa daun pepaya (*Carica papaya* L.) pada mencit jantan *Mus musculus*.

#### c. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu menggunakan hewan uji mencit jantan (*Mus musculus*) dengan menggunakan bahan uji daun pepaya (*Carica papaya* L.). dengan pemberian infusa selama 28 hari berturut-turut dengan cara pemberian melalui oral.

### **3.6 Prosedur Penelitian**

#### **3.6.1 Pembuatan Simplisia dan Determinasi Tanaman**

Pembuatan simplisia dan determinasi tanaman diuji di Badan Penelitian dan Pengamanan (LITBANG) yang berlokasi di Kota Bogor.

#### **3.6.2 Proses Pembuatan Infusa Daun Pepaya**

Untuk menghasilkan simplisia yang berkualitas maka ada beberapa kriteria penting yang harus diperhatikan yaitu tahapan panen dan pascapanen yang perlu diperhatikan yaitu :

##### **1. Pedoman Panen Daun**

Menurut (Kementrian RI dan Badan LITBANG, 2011), Untuk proses pemanenan daun harus dihindari terjadinya kerusakan tanaman. Berikut merupakan pedoman cara pemanenan daun.

- a. Sebelum tanaman memiliki bunga daun harus segera dipanen dan daun yang dipanen adalah daun yang sudah dewasa kecuali dinyatakan lain.
- b. Untuk tanaman berupa pohon, sebisa mungkin menghindari untuk memanen semua daun pada tanaman agar tidak mengganggu proses fisiologi.
- c. Jika daun masih muda perlu dihindari untuk dipanen kecuali sudah diketahui kandungan kimia yang diperlukan.
- d. Jika hasil daun yang dipanen mengalami penurunan dari hasil panen sebelumnya, maka hasil panen harus dibatasi.

## 2. Pedoman Pascapanen

Menurut (Kementrian RI dan Badan LITBANG, 2011), yaitu pengumpulan bahan, sortasi basah, pencucian, penirisan, perubahan bentuk, pengeringan sortasi kering, pengemasan dan penyimpanan.

### a. Sortasi Basah

Sortasi basah adalah menyaring kotoran atau bahan asing dari bagian tanaman lainnya yang tidak diperlukan, kotoran yang disaring yaitu berupa tanah, kerikil, rumput/gluma, bahan yang busuk/ rusak. tujuannya yaitu untuk menjaga kemurnian dan menghindari kontaminasi, mendapatkan simplisia dengan ukuran dan jenis yang serasi, serta mengurangi cemaran mikroba.

### b. Pencucian

Tujuan dari pencucian yaitu untuk membuang kotoran dan tanah yang menempel pada simplisia, dicuci menggunakan air bersih yang mengalir, air bersih yang berasal dari PAM atau sumur. Pencucian dilakukan secepat mungkin untuk bahan yang mengandung senyawa aktif mudah larut air, bahan simplisia yang berasal dari bawah tanah seperti rimpang, akar, dan batang, serta daun yang menempel pada permukaan tanah dilakukan pencucian secara tepat terutama dibersihkan dengan penyemprotan air bertekanan tinggi atau disikat.

### c. Penirisan

Bahan ditiriskan setelah dicuci pada wadah yang sudah disiapkan untuk penirisan, untuk mencegah bertambahnya kandungan air atau terjadinya pembusukan pada bahan, tujuan penirisan yaitu untuk menghilangkan atau mengurangi kandungan air pada permukaan bahan dan dilakukan setelah pencucian segera mungkin, untuk mempercepat penirisan simplisia harus dibolak-balik agar air cepat menguap.

d. Perubahan Bentuk

Beberapa jenis bahan baku perlu dilakukan perubahan bentuk seperti serutan, potongan, dan irisan agar lebih mudah dalam proses pengeringan, sortasi, pengemasan, penyimpanan, dan juga untuk memperbaiki fisik agar lebih praktis dan memenuhi keseragaman bobot. Untuk perubahan bentuk biasanya hanya pada simplisia bunga, daun, kayu, batang, umbi, kulit batang, rimpang dan akar. Perubahan bentuk dilakukan menggunakan pisau dll.

e. Pengeringan

Pada bahan simplisia jarang digunakan dalam bahan segar karena mudah rusak disimpan dalam waktu lama, pengeringan memiliki tujuan untuk mengurangi kadar air agar bahan simplisia tidak rusak oleh pertumbuhan bakteri, jamur dan jasad renik lainnya. Pengeringan dibagi menjadi dua macam yakni :

- Pengeringan sinar matahari langsung digunakan untuk bahan yang cukup kuat seperti biji, kulit kayu, kayu, dan bagian senyawa aktif yang terkandung yang cukup stabil keuntungan dari metode ini yaitu murah dan mudah, kekurangan metode ini bergantung dengan cuaca.
- Pengeringan untuk bagian simplisia yang lunak seperti bunga, daun dll. Sangat cocok menggunakan metode pengeringan dengan cara diangin-anginkan saja tidak perlu dibawah matahari.

f. Sortasi Kering

Sortasi kering memiliki prinsip dan tujuan yang sama seperti sortasi basah hanya saja pada sortasi kering memisahkan bahan asing simplisia yang belum kering keseluruhan dan untuk menjamin bahan bebas dari bahan asing dan pemisahan bentuk dan ukuran dari bahan.

g. Pengemasan dan Pemberian Label

Pengemasan memiliki tujuan agar simplisia terhindar dari kerusakan pada saat proses penyimpanan dan pengiriman, dan terhindar dari sinar matahari, serangga, pencemaran mikrobiologi dan gangguan dari luar agar terjaga mutu dan khasiatnya.

3. Penyiapan Sediaan Uji Infusa

Mekanisme kerja sediaan infusa yaitu pertama sediakan simplisia yang akan di buat sediaan infusa dan ditimbang, kemudian mencampur simplisia dengan volume air yang dibutuhkan kemudian dipanaskan dengan suhu 90°C dengan panci infusa selama kurang lebih 15 menit, dan sesekali di aduk, kemudian saring infusa simplisia selagi panas dengan kain flanel, lalu tambahkan sedikit air panas melewati ampas sampai didapatkan volume infusa yang diinginkan. Setelah dingin infusa diperas jika terkandung minyak atsiri, infusa tidak boleh diperas jika terkandung lendir, dan infusa ditambahkan larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> P 10% b/v dari berat simplisia jika terkandung glikosida antarkuinon (BPOM, 2010).

Kemudian dibuat infusa dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 10% b/v, 20 % b/v, dan 30 % b/v. Dalam membuat sediaan infusa daun pepaya 10 % b/v, daun pepaya sebanyak 10 gram direbus dalam 100 ml aquades dengan suhu 90°C menggunakan panci infusa kurang lebih selama 15 menit, kemudian lakukan hal yang sama pada konsentrasi 20 % b/v menggunakan daun pepaya sebanyak 20 gram dan 30 % b/v menggunakan daun pepaya sebanyak 30 gram setelah itu disaring menggunakan kain flanel (BPOM, 2010).

Infusa yang mengandung bukan bahan khasiat keras, dibuat dengan menggunakan 10% simplisia (Anonim, 1979). Dosis infusa daun pepaya berorientasi dengan konsentrasi 10% pada konsentrasi infusa. Kemudian dibuat konsentrasi pada kelompok perlakuan yaitu 10%, 20% dan 30% dengan volume pemberian untuk mencit adalah 1

ml/20gramBB. Infusa daun pepaya sebanyak 1 ml per oral diberikan pada mencit dengan berat badan 20 gram, maka dosis infusa daun pepaya yang diberikan yaitu sebanyak 5, 10, dan 15 gr/kgBB (Tanti *et al*, 2012).

### 3.6.3 Persiapan Hewan Uji

Hewan coba yang dipakai ialah menggunakan mencit jantan galur BALB/c yang diambil dari peternak pakan reptil di Kab. Bekasi. Umumnya untuk uji eksperimental menggunakan hewan uji tikus/mencit betina karena memiliki sensitifitas yang lebih sensitif dibandingkan jenis kelamin jantan, tetapi menurut beberapa studi secara toksikologi atau toksikokinetik menunjukkan bahwa jenis kelamin jantan lebih sensitif maka dari itu pada penelitian ini menggunakan mencit jantan.

Kriteria hewan uji yang baik yaitu :

- a. Hewan coba dewasa dan tidak sedang sakit
- b. Untuk penggunaan hewan coba betina yang belum pernah beranak atau tidak sedang hamil.
- c. Untuk permulaan uji menggunakan hewan dewasa untuk mencit 5-8 minggu dan untuk tikus 8-12 minggu, dengan variasi berat badan tidak lebih dari 20% dari rata-rata berat badan.

Kemudian mencit didiamkan terlebih dahulu atau adaptasi dengan lingkungan dan lain sebagainya selama kurang lebih 5 hari, sebelum dilakukan perlakuan dengan tujuan agar mencit tidak stres dan dapat menyesuaikan diri dan mencit dalam kondisi stabil.

### 3.6.4 Perlakuan

Perlakuan hewan coba harus dipuasakan terlebih dahulu selama  $\pm$  8-12 jam, hanya diberikan air minum saja, kemudian hewan uji ditimbang dan diberikan sediaan uji dengan sonde. Metode yang digunakan dalam perlakuan yaitu dengan metode pemberian secara oral, ujung spuit diberi kanul, diberikan selama 28 hari, mencit boleh diberikan makan apabila telah

didiamkan selama 1-2 jam dari pemberian, 3-4 jam untuk tikus dari pemberian. Untuk volume pemberian maksimal dapat diberikan tergantung dari ukuran hewan coba, kadar normalnya pemberian tidak lebih 1 mL/20gBB, tetapi jika pelarut yang digunakan hanya air boleh diberikan hingga 2 mL/20gBB (BPOM, 2014).

### 3.6.5 Pembuatan Sediaan Preparat Ginjal

Sebelum melakukan pembedahan mencit dibius menggunakan eter dengan cara dimasukkan kedalam wadah yang berisi eter, setelah itu mencit dibedah dan diambil organ ginjalnya dengan pinset dan gunting bedah. Untuk hewan coba yang telah dibelek/disayat dimasukkan kedalam wadah dan dipendam dalam tanah. Kemudian organ ginjal yang telah diambil di bilas dengan NaCl 0,9 % kemudian di masukkan kedalam vial yang berisi formalin 10 % agar organ tidak mudah rusak.

Perlakuan pertama pembuatan preparat ginjal yaitu difiksasi dengan NBF 10 % kemudian dimasukkan kedalam alkohol 30% dengan waktu 20 menit dengan 3 kali pengulangan. Setelah itu tahap selanjutnya di beri alkohol 40 %, alkohol 50%, alkohol 60%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 96% dalam waktu 1 jam. Kemudian dimasukkan kembali pada larutan xylol alkohol dengan perbandingan 1:1 dalam waktu kurang lebih 24 jam, dan diulang sebanyak 3 kali dengan waktu 20 menit agar jaringan pada ginjal bisa terlihat *transparan* dan dimasukkan kembali kedalam xylol parafin 1:1 dalam waktu 20 menit, kemudian dipanaskan menggunakan oven, kemudian *embedding* dan *bloking* parafin sebanyak 3 kali selama 20 menit kemudian dicetak blok parafin dan kemudian didinginkan.

Perlakuan selanjutnya yaitu pemotongan banyak bagian, bagian ginjal yang telah disiapkan kemudian dibagi (dipotong) dengan ketebalan 5 mikron, setelah itu dimasukkan kedalam air panas hingga irisan mengembang, setelah itu ambil potongan dan letakkan pada kaca objek, yang sudah diberikan albumin, setelah itu dikeringkan. Parafin yang terletak

disekeliling kaca objek dihilangkan atau dibersihkan dengan cara dioven atau di penangas air.

Perlakuan selanjutnya yaitu proses pewarnaan dengan menggunakan xylol sebanyak 3 kali, masing-masing kurang lebih selama 10 menit. Kemudian melakukan rehidrasi (mencegah kerusakan sel) dengan larutan alkohol xylol (alkohol 96% + xylol) kurang lebih selama 5 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam alkohol 80%, alkohol 70%, alkohol 60%, alkohol 50%, alkohol 40%, alkohol 30%, kurang lebih selama 30 menit. Lalu dibersihkan dengan alkohol 30% - 96% selama 30 menit dan dibersihkan menggunakan aquades 1 kali dalam waktu kurang lebih 10 menit, kemudian dibersihkan lagi menggunakan air mengalir hingga bersih. Dan dibersihkan kembali menggunakan aquades setelahnya dibersihkan dengan acid alkohol (alkohol+NaCl 0,9%), setelah itu alkohol 50-96%, dengan eosin kurang lebih selama 2-5 menit setelah itu dengan alkohol 96% dibilas 3 kali. Setelah semuanya sesuai dengan prosedur organnya di keringkan menggunakan penyaring kertas, dan bersihkan sisa kotoran yang ada pada sekeliling jaringan, tahap terakhirnya yaitu direndam dengan xylol sebanyak 2 kali hingga 5 menit, dan ditetesi balsam canada kemudian tutup vial (Nida *et al*, 2018).

### **3.6.6 Pengamatan Preparat Histopatologi Ginjal**

Pengamatan histologi ginjal mencit di bagi menjadi beberapa bagian yaitu 4 Lapang Pandang (LP) menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 200 kali pada bagian korteks ginjal. Tujuan utama dalam membaca preparat ginjal adalah yaitu dengan mengalami beberapa perubahan baik berupa kongesti dan hemorragi.

Kongesti

- 1 = Apabila didalam satu LP tak ditemukan atau terlihat pembuluh darah yang berisi eritrosit.
- 2 = Apabila didalam satu LP ditemukan satu atau terlihat pembuluh darah yang berisi eritrosit.

3 = Apabila didalam satu LP ditemukan dua atau terlihat pembuluh darah yang berisi eritrosit.

4 = Apabila didalam satu LP ditemukan tiga atau terlihat pembuluh darah yang berisi eritrosit.

Hemoragi

1 = Apabila didalam satu LP tidak ditemukan eritrosit atau jaringan interstisial.

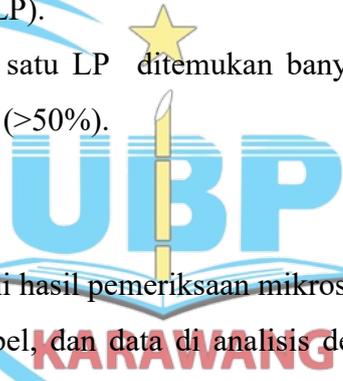
2 = Apabila didalam satu LP ditemukan sedikit eritrosit ataupun didalam jaringan interstisial (<25%LP).

3 = Apabila didalam satu LP ditemukan eritrosit sedang atau jaringan interstisial (<50% LP).

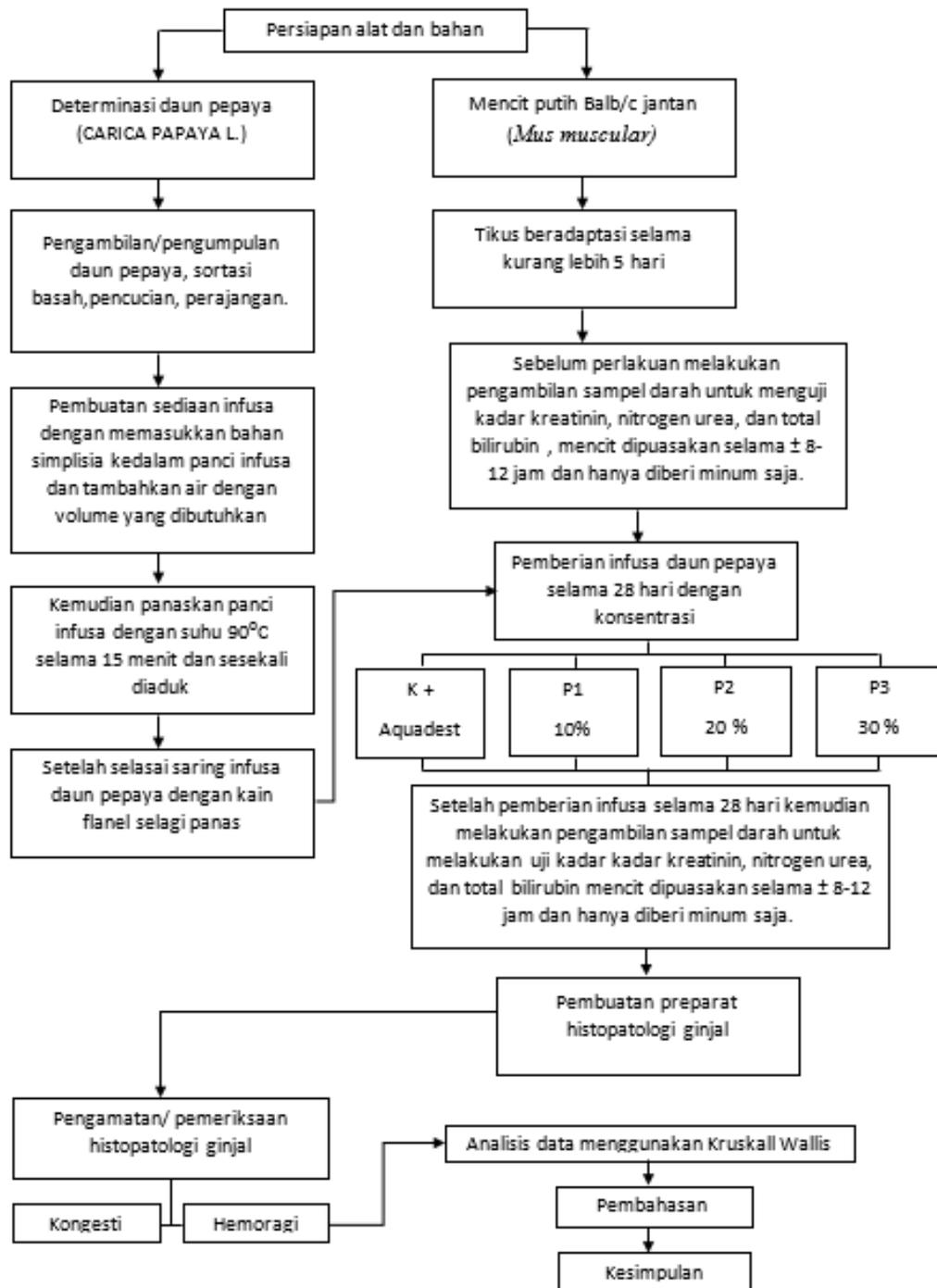
4 = Apabila didalam satu LP ditemukan banyak eritrosit yang berada tersebar interstisial (>50%).

### 3.7 Analisis Data

Pada penelitian ini hasil pemeriksaan mikroskopik berupa data skoring dan kemudian dibuat tabel, dan data di analisis dengan uji Kruskall Wallis dengan validitas data 95 %, dan menggunakan program statistik menggunakan analisis SPSS 16.



### 3.8 Skema Penelitian



Gambar 1. Skema Penelitian