

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *post-test only control group design* dengan tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*) sebagai hewan coba karena pengukuran pada hewan uji dilakukan pada waktu tertentu setelah pemberian perlakuan (Taufiqurohman, 2004). Dipilihnya jenis penelitian ini karena dapat menghasilkan data dengan validitas yang tinggi dan perlakuan dapat diatur oleh peneliti (Sastroasmoro dan Ismael, 2011).

4.2. Lokasi Penelitian

Perlakuan pada tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*) dan pemeriksaan TBARS dilakukan di pemeliharaan hewan coba PAU UGM Yogyakarta, sedangkan pengamatan imunohistokimia dilakukan di Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta oleh ahli di bidang tersebut.

4.3. Subjek Penelitian dan Besar Sampel

Subjek penelitian adalah tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*) umur 3 - 4 bulan, berat badan 150–300 gram, diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada. Makanan tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*) digunakan pakan tikus standar BR I.

Pemilihan hewan coba berdasarkan pertimbangan bahwa *tikus* putih jantan (*Rattus Norvegicus*) paling sering dipakai pada penelitian biomedik, karena secara *commit to user*

genetik mempunyai kemiripan dengan manusia, dan mempunyai kemampuan beradaptasi dalam lingkungan laboratorium (Carson et al., 2005).

Penelitian eksperimental ini dilakukan pada populasi (N) tidak diketahui. Rumus yang dipakai untuk menentukan besar sampel (n) adalah:

$$n = \left[\frac{(Z_{1/2\alpha} + Z_{\beta}) \sigma}{\delta} \right]^2 \text{ (Steel dan Torrie, 1980)}$$

Karena σ^2 sulit ditaksir dari literatur, studi yang sama sebelumnya atau studi pendahuluan oleh peneliti, maka diasumsikan $\sigma^2 \approx \delta^2$, sehingga hasilnya $n = (Z_{1/2\alpha} + Z_{\beta})^2$

$$n = (1,645 + 0,842)^2 = 6,185 \text{ dibulatkan menjadi } 7$$

Keterangan:

- n = besar sampel masing-masing kelompok
- $Z_{1/2\alpha}$ = nilai standar normal, yang besarnya tergantung α
Bila $\alpha = 0,05 \rightarrow Z_{1/2\alpha} = 1,645$
- Z_{β} = nilainya tergantung β yang ditentukan (berdasarkan tabel)
- β = *error* untuk menerima H_0 , bila H_0 salah
Bila $\beta = 0,08 \rightarrow Z_{\beta} = 0,842$
- δ = selisih antara rerata variabel terapi dan kontrol yang diharapkan oleh peneliti
- σ = standar deviasi

Berdasar rumus tersebut didapatkan jumlah sampel minimal adalah tujuh di tambah 10% sebagai cadangan. Dalam penelitian ini digunakan delapan ekor tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*) untuk setiap kelompok observasinya, sehingga telah memenuhi batas minimal sampel.

Sampel penelitian diambil dari 32 ekor tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*) berumur 3-4 bulan dengan berat badan 150-300 gram. Makanan tikus digunakan pakan tikus standar BR I dengan jumlah pakan disesuaikan rata-rata berat badannya sedangkan minum diberikan secara bebas (*at libitum*). Alokasi hewan coba kedalam

masing-masing perlakuan yang homogen dilakukan secara random untuk mempertahankan validitas internal (Kuntoro, 1994). Setiap anggota sampel mempunyai kesempatan yang sama sebagai sampel kontrol maupun terapi.

Kriteria inklusi :

1. Tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*) sehat yaitu tikus putih jantan dengan kondisi mata bersinar, bulu tidak kusam, aktif dan nafsu makan baik (Kusumawati, 2004).
2. Umur 3 – 4 bulan.
3. Berat badan 150 – 300 gram.

Kriteria eksklusi :

1. Tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*) mati saat penelitian.

Hewan coba model penyakit ginjal kronik.

Hewan coba model penyakit ginjal kronik, digunakan metode *Unilateral ureteral obstruction* (UUO). Model ini berguna untuk memeriksa mekanisme fibrosis interstisial *in vivo*. Model ini dapat di induksi baik mencit atau tikus dan tidak tergantung *strain* tertentu. Model ini dalam waktu 24 jam dapat mengurangi aliran darah ginjal dan LFG. Respons berikutnya termasuk inflamasi interstisial (puncaknya 2-3 hari), dilatasi tubular, atrofi tubular dan fibrosis terjadi mulai 7 hari (Hai-Chun et al., 2010). Keuntungan digunakannya model ini adalah tidak adanya toksin eksogen, tidak adanya lingkungan uremik dan ketersediaan ginjal kontralateral sebagai kontrol (Chevalier RL et al., 2016).

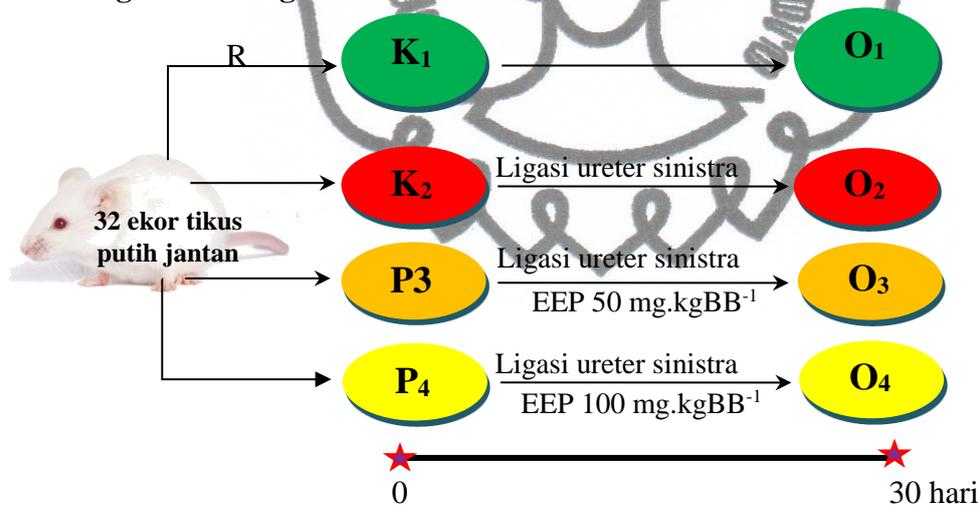
4.4. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap, *post-test only control group design*. Perlakuan terdiri dari: (K1) kontrol negatif (KN), (K2)

kontrol positif (KP), (P3) terapi (EEP I) dan (P4) terapi (EEP II), dengan masing-masing sampel terdiri dari delapan ekor tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*). Alokasi hewan coba kedalam masing-masing perlakuan yang homogen dilakukan secara random untuk mempertahankan validitas internal (Kuntoro, 1994). Setiap anggota sampel mempunyai kesempatan yang sama sebagai sampel kontrol maupun terapi.

Pengukuran awal tidak dilakukan karena dianggap sama untuk semua kelompok yang berasal dari satu populasi, sehingga dapat dikembangkan rancangan eksperimental tanpa adanya pengukuran awal (*pretest*), tetapi hanya pengukuran akhir (*post test*)/ *post-test only control group design* (Sastroasmoro dan Ismael, 2011).

4.5. Bagan Rancangan Penelitian



Gambar 4.1. Bagan Rancangan Penelitian

Keterangan:

R : Randomisasi

EEP : Ekstrak etanol propolis

K₁ : Kelompok kontrol negatif dengan pemberian aquadest

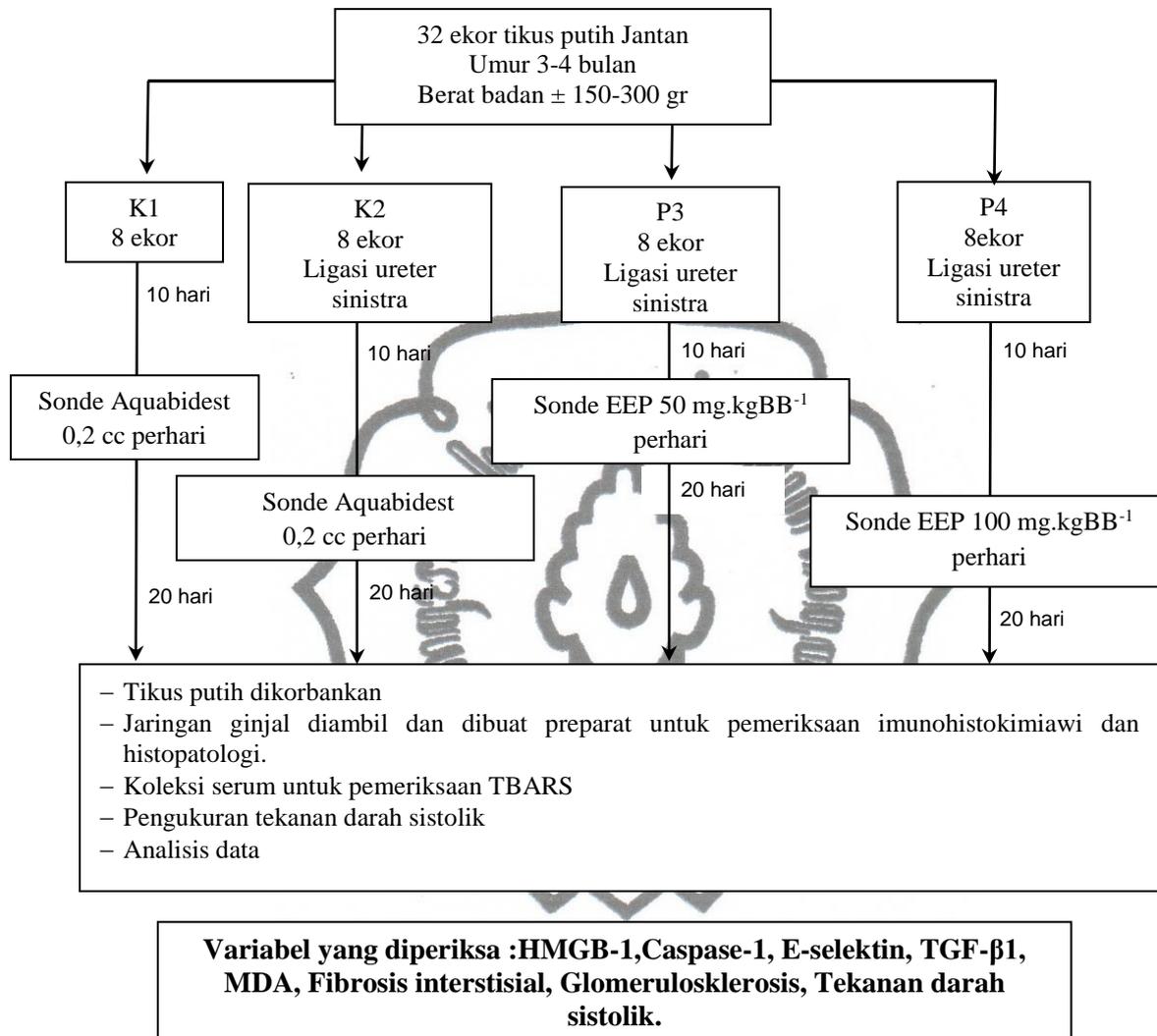
K₂ : Kelompok kontrol positif (penyakit ginjal kronik dengan pemberian aquadest)

P₃ : Kelompok terapi (penyakit ginjal kronik + EEP dosis 50 mg.kgBB⁻¹)

P₄ : Kelompok terapi (penyakit ginjal kronik + EEP dosis 100 mg.kgBB⁻¹)

commit to user

4.6. Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.2. Kerangka Operasional Kajian Molekuler Ekstrak Etanol Isolat Propolis Gunung Lawu Terhadap Sistem Imunitas Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Jantan Model Penyakit Ginjal Kronik

4.7. Penjelasan Kerangka Operasional

Sebanyak 32 ekor tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*), berumur 3-4 bulan dengan berat badan 150-300 gram dibagi dalam empat kelompok masing-masing berjumlah delapan ekor.

Perlakuan terdiri dari :

- K₁ : kelompok kontrol negatif dengan pemberian aquadest
- K₂ : kelompok penyakit ginjal kronik (Ligasi ureter sinistra+ aquadest)
- P₃ : kelompok terapi (Ligasi ureter sinistra+EEP dosis 50 mg.kgBB⁻¹)
- P₄ : kelompok terapi (Ligasi ureter sinistra+EEP dosis 100 mg.kgBB⁻¹)

Tahapan Penelitian :

Tahap 1 : Perlakuan ligasi ureter sinistra, setelah 10 hari menunjukkan aktivitas oksidatif dan inflamasi kronik pada hewan coba kelompok perlakuan K₂, P₃ dan P₄.

Tahap 2 : Perlakuan aktivitas oksidatif dan inflamasi kronik serta antioksidatif dan inflamasi kronik setelah hari ke sepuluh sampai dengan hari ke tigapuluh diperlakukan sesuai perlakuan yaitu :

K₁ = Perlakuan kontrol, tikus disonde dengan bahan pelarut aquadest 0,2 ml/hari.

K₂ = Perlakuan kelompok penyakit ginjal kronik yaitu tikus diligasi ureter sinistra, dan disonde dengan bahan pelarut aquadest 0,2 ml/hari setiap pagi hari.

P₃ = Perlakuan terapi 1, yaitu tikus diligasi ureter sinistra, dan disonde ekstrak etanol isolat propolis (EEP) dosis 50 mg.kgBB⁻¹ setiap pagi hari.

P₄ = Perlakuan terapi 2, yaitu tikus diligasi ureter sinistra, dan disonde ekstrak etanol isolat propolis (EEP) dosis 100 mg.kgBB⁻¹ setiap pagi hari.

Efek antiinflamasi dan anti oksidatif ditunjukkan oleh kandungan yang ada di propolis lebah yaitu CAPE (Lotfy, 2006). Sonde dilakukan satu kali sehari selama 20 hari berturut-turut (Buraimoh *et al.*, 2012).

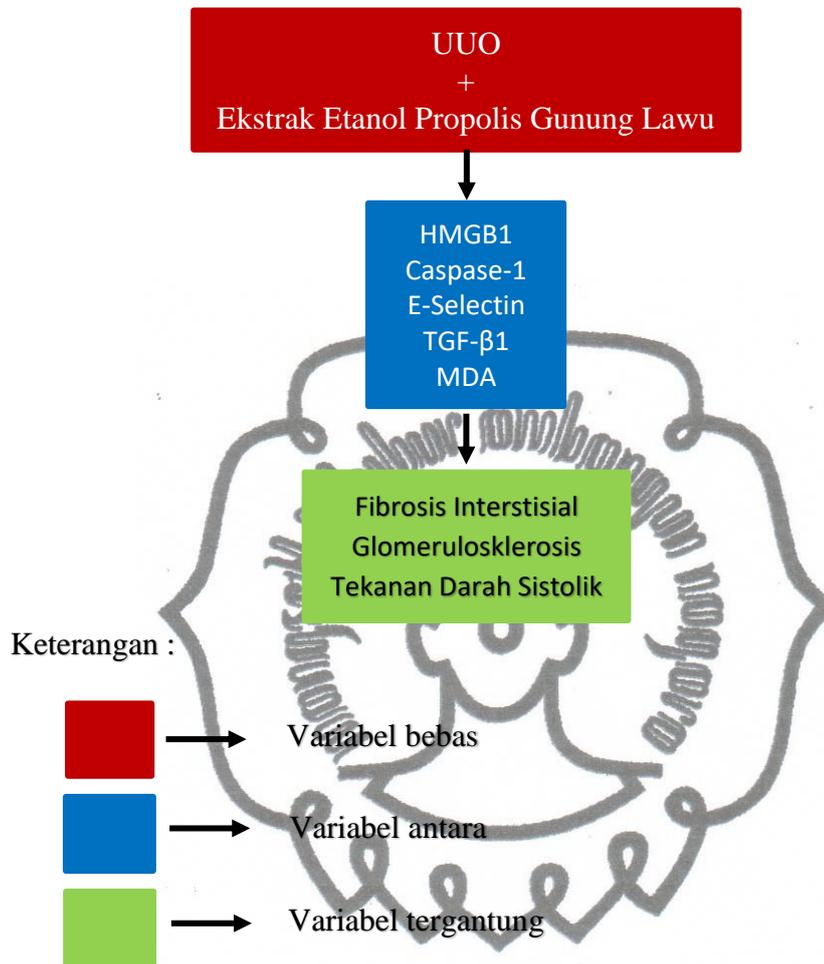
Tahap 3. Setelah selesai Perlakuan

Perlakuan hewan coba dikerjakan di Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pengukuran tekanan darah sistolik dilakukan setiap minggu dari awal sampai akhir perlakuan.

Tikus putih dikorbankan 30 hari setelah perlakuan, dengan cara *dislokasi servikal*. Jaringan ginjal diambil dan dibuat preparat histopatologi menurut metode standar Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta, masing-masing perlakuan sebanyak delapan ekor tikus. Setiap sampel dibuat sebagai preparat histologi, untuk pemeriksaan imunohistokimiawi (HMGB-1, Caspase-1, E-selektin dan TGF- β 1) dan pemeriksaan histopatologi (Fibrosis Interstisial, Glomerulosklerosis) yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta. Koleksi serum untuk pemeriksaan kadar MDA dilakukan pada akhir penelitian, selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar MDA dengan metode TBARS di Laboratorium PAU Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Perlakuan terhadap hewan coba pada penelitian ini sudah memenuhi prinsip 3R sesuai ketentuan *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs) dan mendapatkan persetujuan dari komite etik penelitian kesehatan Universitas Sebelas Maret Surakarta.

4.8. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 4.3. Kerangka Konsep Penelitian

4.9. Variabel Penelitian.

Klasifikasi variabel diukur menurut tujuan penelitian dan digolongkan dalam beberapa variabel sebagai berikut:

4.9.1. Variabel bebas:

Pemberian ekstrak etanol propolis gunung Lawu dan rangsangan tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*) dilakukan dengan cara ligasi ureter sinistra, sehingga akan terjadi *ischemic reperfusion injury* yang akan memicu stres oksidatif serta inflamasi di ginjal dan akan terjadi penyakit ginjal kronik. Variabel tersebut meliputi:

1. Penyakit ginjal kronik (KP)/Ligasi ureter sinistra
2. Penyakit ginjal kronik (KP)/Ligasi ureter sinistra dikombinasi dengan EEP dosis 50 mg.kgBB⁻¹.
3. Penyakit ginjal kronik (KP)/Ligasi ureter sinistra dikombinasi dengan EEP dosis 100 mg.kgBB⁻¹.

4.9.2. Variabel tergantung:

Variabel tergantung adalah variabel yang akan diteliti, yaitu perubahan respon imun yang terjadi di jaringan ginjal dari tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*) yang dirangsang ligasi ureter sinistra maupun kombinasi ligasi ureter sinistra dan EEP.

Variabel tersebut meliputi:

1. HMGB-1
2. Caspase-1
3. E-selektin
4. TGF-β1
5. MDA
6. Fibrosis Interstisial
7. Glomerulosklerosis
8. Tekanan darah sistolik

4.9.3. Variabel kendali:

1. Hewan coba : jenis tikus, umur dan jenis kelamin, homogen.

2. Pemeliharaan dan bahan makanan, minuman, sanitasi kandang, kelembaban dikondisikan sama.
3. Sonde : teknik sonde pada tikus.
4. Pengambilan jaringan ginjal: teknik pengambilan jaringan, fiksasi dan pemotongan jaringan ginjal untuk preparat.
5. Pewarnaan preparat: teknik pewarnaan dan pembacaan histologi.

4.10. Batasan Operasional

1. Pemberian propolis

Propolis lebah pada penelitian ini diperoleh dari peternak lebah di daerah Kecamatan Kerjo, Kabupaten Karanganyar, Surakarta, Jawa Tengah. Proses pembuatan ekstrak propolis lebah dilakukan dengan teknik maserasi. Propolis kering dibersihkan dan diblender hingga halus selanjutnya ditimbang sebanyak 500 gram, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker. Proses maserasi dilakukan dengan menambahkan 3,75 liter etanol 70% sebagai pelarut (Trusheva et al., 2007). Campuran bahan disimpan selama tujuh hari pada ruangan yang tidak terkena sinar matahari dengan dikocok kuat atau pengadukan dengan spatula pengaduk sebanyak dua kali tiap hari (Susilo et al., 2006).

Tahap selanjutnya dilakukan penyaringan dengan corong buchner dan kertas saring untuk memisahkan filtrat dari ampas ke dalam labu Erlenmeyer sehingga diperoleh filtrat. Hasil filtrasi (penyaringan) yang didapat dievaporasi dengan rotary evaporator pada suhu 45°C dengan tekanan vakum (<1 atm) selama kurang lebih 4 jam sehingga diperoleh ekstrak propolis yang konsentrasinya kental (± 100 g). Selanjutnya ekstrak propolis diuapkan selama 24 jam di dalam

gelas beaker sehingga kandungan etanolnya menguap (Fu et al., 2005). Dosis propolis yang digunakan adalah dosis 50 mg/kgBB dan 100 mg/kgBB yang diberikan secara peroral setiap hari.

2. HMGB-1

Adalah protein yang terdiri dari 215 asam amino, dengan berat molekul 30 kDa. Berikatan dengan mediator inflamasi seperti LPS, DNA atau IL-1 β dan menginduksi jalur sinyal yang mengarah ke aktivasi NF κ B sehingga mengaktifasi respons inflamasi. Penilaian positifitas ekspresi HMGB-1 menggunakan pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal terhadap HMGB-1. Cara ukur dinilai secara kuantitatif visual dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap sel yang mengekspresikan HMGB-1. Kemudian dihitung jumlah sel-sel tersebut yang imunoreaktif tercatat coklat perak pada membran sel. Persentase jumlah semua sel imunoreaktif yang ditemukan kemudian dilakukan skoring yaitu skor 1 = 1–30%, skor 2 = 31–70% dan skor 3 > 70% (Ummanni et al., 2010). Skala data berupa ordinal.

3. Caspase-1

Adalah suatu protease sistein yang mempunyai peran penting pada apoptosis, pembelahan protein target menuju kematian sel. Merupakan caspase inflamasi sebagai protease kunci yang terlibat dalam penghancuran sel selama apoptosis (Boland et al., 2013). Penilaian positifitas ekspresi caspase-1 menggunakan pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal terhadap caspase-1. Cara ukur dinilai secara kuantitatif visual dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap sel yang mengekspresikan caspase-1.

Kemudian dihitung jumlah sel-sel tersebut yang imunoreaktif tercat coklat perak pada membran sel. Persentase jumlah semua sel imunoreaktif yang ditemukan kemudian dilakukan skoring yaitu skor 1 = 1–30%, skor 2 = 31–70% dan skor 3 > 70% (Ummanni et al., 2010). Skala data berupa ordinal.

4. E-selektin

Adalah molekul adhesi sel yang diekspresikan hanya pada sel endotel yang diaktifkan oleh sitokin dan berperan penting dalam inflamasi. Penilaian positifitas ekspresi E-selektin menggunakan pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal terhadap E-selektin. Cara ukur dinilai secara kuantitatif visual dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap sel yang mengekspresikan E-selektin. Kemudian dihitung jumlah sel-sel tersebut yang imunoreaktif tercat coklat perak pada membran sel. Persentase jumlah semua sel imunoreaktif yang ditemukan kemudian dilakukan skoring yaitu skor 1 = 1–30%, skor 2 = 31–70% dan skor 3 > 70% (Ummanni et al., 2010). Skala data berupa ordinal.

5. TGF- β 1

Adalah suatu protein regulator multifungsi yang memodulasi proliferasi sel, diferensiasi, apoptosis, adhesi dan migrasi berbagai jenis sel dan menginduksi produksi matrik ekstra seluler. Pada penyakit ginjal kronik terjadi peningkatan ekspresi TGF- β 1 dan reseptor TGF- β 1 pada glomerulus dan tubulo interstisial. Penilaian positifitas ekspresi TGF- β 1 menggunakan pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal terhadap TGF- β 1. Cara ukur dinilai secara kuantitatif visual dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x

terhadap sel yang mengekspresikan TGF- β 1. Kemudian dihitung jumlah sel-sel tersebut yang imunoreaktif tercatat coklat perak pada membran sel. Persentase jumlah semua sel imunoreaktif yang ditemukan kemudian dilakukan skoring yaitu skor 1 = 1–30%, skor 2 = 31–70% dan skor 3 > 70% (Ummanni et al., 2010). Skala data berupa ordinal.

6. MDA

Kadar MDA diukur dari cairan serum sampel darah tikus putih jantan sebesar 1,5 cc yang diambil setelah akhir penelitian, kemudian disentrifuge untuk selanjutnya cairan serum diukur kadar MDA secara kuantitatif dengan metode TBARS di laboratorium PAU FK UGM. Sehingga didapatkan skala data numerik.

Parameter	Definisi	Alat Ukur	Satuan Data	Skala Data
MDA	<ul style="list-style-type: none"> – senyawa organik dengan rumus $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$. – spesies reaktif ini terjadi secara alami dan merupakan penanda untuk stres oksidatif. 	TBARS	pg/ml	Numerik

7. Fibrosis Interstitial Ginjal

Adalah suatu keadaan dimana terjadi penumpukan kolagen tipe-I yang berlebihan di interstitial ginjal terutama disekitar fibroblas dan tubulus proksimal. Dengan pengecatan Verhoeff-Van Gieson akan terlihat kemerahan. Penilaian fibrosis interstitial ditentukan secara kuantitatif dengan cara mengukur tebal jaringan interstitial dengan menggunakan mikrometer yang telah dikalibrasi pada pembesaran 400 x. Data untuk ketebalan fibrosis interstitial

ditentukan dengan cara mengukur tebal fibrosis interstisial dengan mikrometer yang telah dikalibrasi, dimana satu skala mikrometer pada lensa okuler berarti 30 mikrometer (1 skala okuler = 30 mikron). Penentuan daerah yang diukur ditentukan secara subyektif pada area yang dianggap paling tebal. Pada setiap slide pengukuran dilakukan pada lima lapangan pandang yang berbeda pada pemebesaran 400x. Selanjutnya hasil pengukuran pada setiap lapangan pandang dijumlahkan kemudian dibagi lima (Tamaki et al., 1994).

8. Glomerulosklerosis

Adalah suatu keadaan dimana terjadi penumpukan kolagen tipe-IV pada glomerulus ginjal terutama di sekitar sel mesangial. Pada pengecatan Verhoeff-Van Gieson dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x akan terlihat kemerahan. Derajat untuk penilaian histopatologi glomerulosklerosis ditentukan sebagai berikut : 30 glomerulus diseleksi secara acak dan derajat ekspansi matrik glomerulosklerosis atau Indeks Sklerosis (IS) ditentukan secara semikuantitatif menurut metode Tamaki et al (1994). Menurut metode ini terdapat dua tahap penentuan indeks sklerosis, yaitu sebagai berikut :

Tahap Pertama. Menentukan persentase sklerosis pada tiap glomerulus, yaitu

Skor 0 : bila tidak terjadi sklerosis

Skor 1 : bila derajat sklerosis antara 1% hingga 25%

Skor 2 : bila derajat sklerosis antara 26% hingga 50%

Skor 3 : bila derajat sklerosis antara 51% hingga 75%

Skor 4 : bila derajat sklerosis antara 75% hingga 100%

Tahap Kedua. Menentukan Indeks Sklerosis (IS) dengan rumus sebagai berikut

$$IS = [\{ 0x n_0 + 1x n_1 + 2x n_2 + 3x n_3 + 4x n_4 \} / 30] \times 100$$

Keterangan :

n₀ = Jumlah glomerulus dengan skor 0

n₁ = Jumlah glomerulus dengan skor 1

n₂ = Jumlah glomerulus dengan skor 2

n₃ = Jumlah glomerulus dengan skor 3

n₄ = Jumlah glomerulus dengan skor 4

Cara mendapatkan lapangan pandang sama dengan prosedur pengamatan immunohistokimia. Pengamatan dibatasi pada 30 glomerulus yang berbeda. Pada manusia 10 glomerulus sudah dianggap representatif. Pada penelitian ini yang menggunakan tikus putih jantan galur Swiss sebagai hewan coba, pengamatan dilakukan terhadap 30 glomerulus yang berbeda. Pada setiap glomerulus yang diamati selanjutnya dilakukan skoring terhadap derajat sklerotik yang terjadi (angka masuk dalam tabel). Nilai skoring dari glomerulus ke-1 hingga ke-30 dimasukkan kedalam rumus kemudian dibagi 30 dan dikalikan 100 untuk mendapatkan nilai Indeks sklerosis.

9. Tekanan darah sistolik

Tekanan darah hewan uji diukur dengan cara *tail cuff methode* menggunakan alat *blood pressure analyzer* untuk hewan uji. Metode ini memungkinkan peneliti untuk mengetahui tekanan darah sistolik. Tekanan darah

hewan uji diukur setiap minggu dari awal sampai akhir perlakuan, dengan satuan mmHg. Sehingga didapatkan skala data numerik.

4.11. Prosedur Pelaksanaan Penelitian

4.11.1 Teknik Pemeriksaan TBARS.

Setelah serum tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*) dikumpulkan, disentrifuge 1.500 rpm selama 15 menit untuk kemudian disimpan pada suhu -60°C . Pengukuran kadar MDA serum dikerjakan dengan metode spektrofotometri. Prinsip kerjanya adalah dengan menggunakan reaksi NWK-MDA01 assay berdasarkan reaksi MDA dengan TBA (*thiobarbituric acid*) absorpsi dibaca dengan panjang gelombang 532 nm. Malondialdehid diukur menggunakan konsentrasi *thiobarbituric acid reactive substances* menggunakan teknik TBARS dengan tahapan sebagai berikut (Wuryastuti et al., 1996):

1. Masukkan 750 μl asam fosfat kedalam *tube polyproene* 13 ml.
2. Tambahkan 50 μl standart/sampel/blangko.
3. Campur dengan 250 μl 40 mM larutan TBA.
4. Tambahkan 450 μl aquabides pada masing-masing tube.
5. Campur dan masukkan ke dalam penangas air suhu 60°C selama 1 jam.
6. Keluarkan standart (*1,1,3,3-tetraethoxypropane*)/sampel/blangko tube dari penangas air dan masukkan ke dalam es bath.
7. Penyiapan kolom Sep-Pak C_{18} : cuci dengan memasukkan metanol 5 ml, kemudian dibuang.
8. Masukkan aquabides 5 ml, kemudian dibuang.
9. Masukkan sampel, kemudian dibuang.

10. Masukkan aquabides 4 ml, kemudian dibuang.
11. Masukkan metanol 4 ml, kemudian ditampung.
12. Kemudian dibaca dengan spektrofotometer panjang gelombang λ 532 nm.

4.11.2 Teknik Pembuatan Preparat Imunohistokimia.

Ginjal dikeluarkan, dipangkas dan ditimbang. Bobot relatif organ dihitung. Bobot relatif organ (%) dihitung sebagai g/100g berat badan. Spesimen dari ginjal difiksasi segera dalam 10% buffered formalin untuk uji imunohistokimiawi HMGB-1, Caspase-1, E-selektin dan TGF- β 1.

Teknik pewarnaan imunohistokimia adalah pewarnaan imuno-peroksidase indirek dengan metode *avidin biotin complex* (ABC) tiga fase dengan tahapan sebagai berikut (Tomino, 2000):

1. Dilakukan deparafinisasi sayatan jaringan untuk menghilangkan parafin dari jaringan. Deparafinisasi dilakukan dengan cara standar baku laboratorium, yaitu secara bertahap dengan waktu tertentu memasukkan preparat kedalam cairan aseton, *xylol*, alkohol 100%, alkohol 90%, alkohol 80%, alkohol 70% dan air.
2. Cuci jaringan dengan PBS pH 7,4.
3. Inkubasi jaringan dengan tripsin 0,125 % pada temperatur 37 °C selama 5-10 menit, untuk membuka *masking antigen*.
4. Jaringan diinkubasikan dengan H₂O₂ 0,5% dalam metanol selama 30 menit untuk menghilangkan pewarnaan endogen dan dibiarkan pada temperatur ruangan.
5. Cuci dengan air mengalir selama 1 menit, diikuti pencucian dengan aquadestilata.
6. Tandai jaringan dan cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit.

7. Inkubasi dengan 3% serum yang dilarutkan dalam BSA 1% selama 20 menit.
8. Cuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak dua kali, masing-masing selama 3 menit.
9. Jaringan di inkubasi dengan monoklonal antibodi primer yaitu *murine monoclonal antibody* terhadap molekul (HMGB-1, Caspase-1, E-selektin dan TGF- β 1) dari *mouse* (Santa Cruz, US). Monoklonal antibodi dilarutkan dengan TRIS-PBS 1:200. Untuk jaringan seluas 1 cm² diperlukan 100 μ L monoklonal antibodi. Inkubasi dilakukan selama 30 menit dalam ruang lembab.
10. Cuci jaringan dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.
11. Inkubasi jaringan dengan antibodi primer yaitu antibodi *anti murine* yang telah dibiotinilisasi (Dako Kit). Lama inkubasi 30 menit.
12. Cuci jaringan dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.
13. Inkubasi jaringan dengan streptavidin-biotin peroksidase (Dako Kit) selama 30 menit.
14. Cuci jaringan dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.
15. Inkubasi jaringan dengan substrat (Dako Kit) sampai timbul warna coklat pada jaringan, selama \pm 15 menit.
16. Cuci jaringan dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.
17. Warnai jaringan dengan Hematoksilin.
18. Cuci jaringan dengan air mengalir.
19. Tutup jaringan dengan kaca penutup (*deck glass*) dan lem dengan entelan.
20. Ekspresi molekul yang positif dengan monoklonal antibodi primer akan terlihat berwarna coklat dibawah mikroskop cahaya. Sel yang positif dihitung dalam persentase.

21. Dari setiap pelaksanaan pewarnaan dibuat kontrol positif dan kontrol negatif.
22. Dilakukan pembacaan preparat IHC oleh ahlinya serta di hitung nilai kappa dan dinyatakan baik bila nilai kappa lebih dari 0,8.

4.12. Analisis Data

Data berskala kategorik (ordinal) yang diperoleh meliputi ekspresi HMGB-1, Caspase-1, E-selektin, TGF- β 1, fibrosis interstisial dan glomerulosklerosis akan diuji menggunakan uji non-parametrik, dengan menggunakan program *SPSS for Windows Release 22*. Hasil pengujian dianggap bermakna bila harga $p < 0,05$. Dengan rancangan analisis statistik, yaitu:

- a) Uji Kruskal Wallis untuk mengetahui uji beda respons akibat UUO dibandingkan dengan UUO yang dikombinasikan EEP baik dosis I dan II.
- b) Uji Man-Whitney untuk mengetahui perbedaan *mean rank* antar kelompok.

Data numerik (MDA dan Tekanan darah sistolik) yang diperoleh setelah memenuhi kriteria akan diuji menggunakan uji F Anova, dengan menggunakan program *SPSS for Windows Release 22*. Hasil pengujian dianggap bermakna bila harga $p < 0,05$.

Dengan rancangan analisis statistik, yaitu:

- a) Uji Shapiro wilk untuk menguji normalitas distribusi data.
- b) Uji homogenitas menggunakan *levene's test* untuk menguji homogenitas varian.
- c) Uji F Anova untuk uji beda respons akibat UUO dibandingkan dengan UUO yang dikombinasikan EEP baik dosis I dan II.
- d) Uji post-hoc LSD untuk mengetahui perbedaan mean antar kelompok.