

## BAB III

### METODELOGI PENELITIAN

#### 3.1 Rang Lingkup Penelitian

Pada penelitian ini mencakup ruang lingkup keilmuan bidang Patologi Anatomi , Histologi, dan Farmakologi.

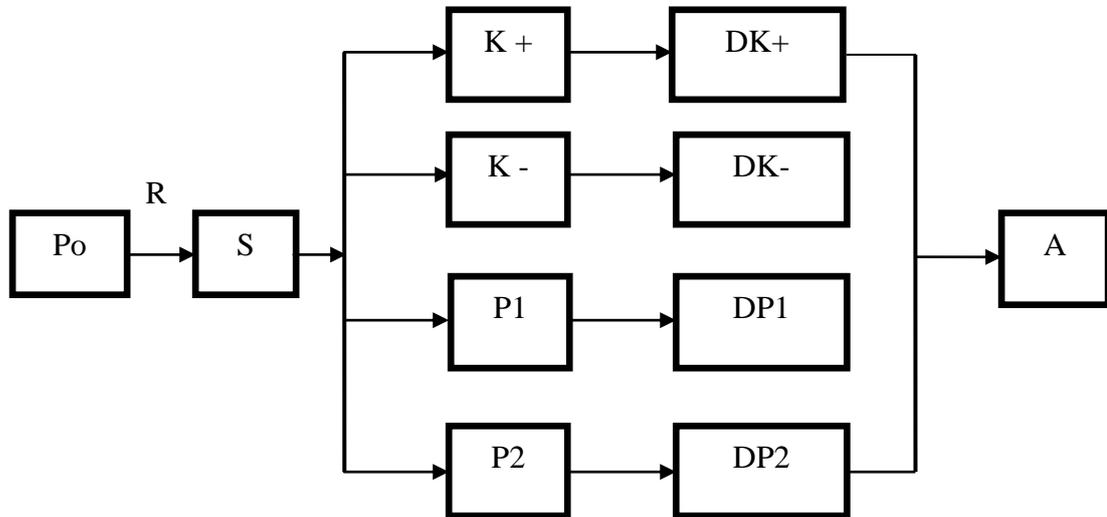
#### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

- 1) Tempat pemeliharaan dan intervensi terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
- 2) Tempat pembuatan ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro, Semarang.
- 3) Pembuatan dan pengecatan preparat hepar hewan coba dilakukan di Laboratorium Sentral Patologi Anatomi RS St. Elisabeth, Semarang.
- 4) Penelitian dan pengumpulan data berlangsung dari bulan Mei-Agustus 2017.

#### 3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *true experiment* dengan metode *Post Test Only Control Group Design*, yang menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian. Perlakuan berupa pemberian ekstrak daun sukun pada tikus Wistar jantan yang diinduksi DEN dengan parameter pengukuran variabel yaitu gambaran mikroskopis hepar. Penelitian tidak diawali dengan pre tes karena

penelitian ini pengambilan organ untuk pemeriksaan hanya bisa dilakukan satu kali, sehingga tidak memungkinkan untuk dilakukan keduanya.



**Gambar 7.** Rancangan Penelitian

Keterangan:

Po : Populasi tikus

R : Random sampling sederhana

S : Sampel

K + : Kelompok kontrol positif, tikus wistar jantan yang diberi pakan standar secara *ad libitum* dan pemberian DEN secara intraperitoneal dengan dosis 50mg/kgBB satu minggu sekali yang diberikan selama 56 hari.

K - : Kelompok kontrol negatif, tikus wistar jantan yang diberi pakan standar secara *ad libitum* selama 56 hari.

P : Kelompok perlakuan, terdiri dari :

- P1 : Perlakuan 1, tikus wistar jantan yang diberi pakan standar secara *ad libitum* dan pemberian DEN secara intraperitoneal dengan dosis 50mg/kgBB satu minggu sekali. Setelah 60 menit diberikan ekstrak daun sukun per oral dengan dosis 200mg/kgBB dengan bantuan sonde. Perlakuan 1 dilakukan selama 56 hari.
- P2 : Perlakuan 2, tikus wistar jantan diberi pakan standar secara *ad libitum* dan pemberian DEN secara intraperitoneal dengan dosis 50mg/kgBB satu minggu sekali. Setelah 60 menit diberikan ekstrak daun sukun dengan dosis 200mg/kgBB dan ditambah madu dengan dosis 2g/kgBB dengan bantuan sonde. Perlakuan 2 dilakukan selama 56 hari.

DK+ : Data hasil pengamatan histopatologi hepar tikus K+

DK- : Data hasil pengamatan histopatologi hepar tikus K-

DP1-DP2 : Data hasil pengamatan histopatologi hepar tikus P1,P2

A : Analisis Data

### **3.4 Populasi dan Sampel Penelitian**

#### **3.4.1 Populasi Penelitian**

Populasi dari penelitian ini adalah tikus wistar jantan.

#### **3.4.2 Sampel Penelitian**

Sampel penelitian diambil dari populasi secara acak dan memenuhi kriteria inklusi, eksklusi, dan *drop out*.

#### **3.4.2.1 Kriteria inklusi**

1. Tikus Wistar jantan
2. Umur 2-3 bulan
3. Berat badan rata-rata 160-200 gram
4. Sehat
5. Morfologi tampak normal

#### **3.4.2.2 Kriteria Eksklusi**

1. Terdapat kecacatan anatomis

#### **3.4.2.3 Kriteria Drop out**

1. Tikus mati dalam masa penelitian

#### **3.4.3 Cara Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana (*Simple random Sampling*) dimana peletakan perlakuan diacak pada seluruh materi percobaan. Hal ini berarti seluruh unit percobaan mempunyai peluang yang sama besar untuk menerima perlakuan.

#### **3.4.4 Estimasi Besar Sampel**

Penentuan besar sampel minimal yang digunakan menurut *Institutional Animal Care And Use Comitee Guidebook* dan *World Health Organization* (WHO) adalah 5 ekor tiap kelompok dengan menganut prinsip 3R (*Replacement, Reduction and Refinement*). Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan

adalah 20 ekor tikus strain Wistar jantan, tiap kelompok masing-masing sejumlah 5 ekor. Sedangkan untuk mengantisipasi dikeluarkannya tikus akibat adanya kriteria *drop out*, maka pada tiap kelompok akan ditambahkan satu ekor tikus sehingga jumlah sampel yang digunakan adalah 24 ekor.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*), madu, dan DEN.

#### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah derajat fibrosis hepar pada tikus Wistar jantan.

### 3.6 Definisi Operasional

**Tabel 6.** Definisi Operasional

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
Bebas	Ekstrak daun sukun	Daun sukun yang diujikan dalam penelitian ini dikumpulkan dari lingkungan sindang mulyo. Daun sukun dicuci lalu dikeringkan, setelah kering akan digiling dengan sampel mill hingga ukuran 40 mesh. Setelah digiiling, serbuk dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer dan diberi 100ml metanol. <sup>53</sup> Dosis yang digunakan adalah 200mg/kgBB	Nominal

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
Bebas	Madu	Madu yang akan diujikan adalah madu murni As-Syifa yang bisa memperbaiki stress oksdatif. Dosis yang digunakan adalah 2g/kgBB.	Nominal
Bebas	Dietilnitrosamin	Penggunaan dietilnitrosamin pada penelitian ini adalah 50mg/kgBB secara intraperitoneal selama 56 hari.	Nominal
Terikat	Derajat fibrosis hepar	<p>Tikus wistar jantan yang diamati di bawah mikroskop yang telah mengalami perlakuan selama 56 hari berupa sel hepar yang telah mengalami kerusakan. Dari setiap tikus dibuat satu preparat jaringan hepar dengan pengecatan <i>Masson's Trichrome</i> dan setiap preparat dibaca dalam 5 lapangan pandang dengan pembesaran mikroskopis 400x. Penelitian derajat fibrosis berdasarkan derajat Laennec.<sup>43</sup></p> <p>Grade 0 : Tidak ditemukan fibrosis</p> <p>Grade 1 : Fibrosis minimal</p> <p>Grade 2 : Fibrosis ringan</p> <p>Grade 3 : Fibrosis sedang</p> <p>Grade 4A : Sirosis, mild definite atau probable</p> <p>Grade 4B : Sirosis sedang</p> <p>Grade 4C : Sirosis berat</p>	Ordinal

Penilaian untuk penentuan derajat fibrosis hepar dinilai menggunakan sistem penentuan derajat semi kuantitatif Laennec.

**Tabel 7.** *Laennec Scoring System*

Grade	Nama	Septa (Ketebalan & Jumlah)	Kriteria	Skor
0	Tidak ada fibrosis			0
1	Fibrosis minimal	+/-	Tidak ada septa atau sedikit septa tipis; mungkin didapatkan ekspansi portal atau fibrosis sinusoidal ringan	1
2	Fibrosis ringan	+	Beberapa septa tipis; mungkin didapatkan ekspansi portal atau fibrosis sinusoidal ringan	2
3	Fibrosis sedang	++	Septa tipis moderat; hingga sirosis inkomplit.	3
4A	Sirosis, <i>mild definite or probable</i>	+++	Septa tampak jelas dengan kontur melingkar atau nodul yang tampak jelas. Sebagian besar septa berukuran tipis. (diperbolehkan adanya satu septa berukuran luas)	4
4B	Sirosis sedang	++++	Setidaknya terdapat dua septa yang luas, tetapi tidak ada septa yang sangat luas	5

			dan didapatkan nodul kecil kurang dari separuh panjang biopsi	
4C	Sirosis berat	+++++	Setidaknya terdapat satu septa yang sangat luas atau didapatkan nodul kecil lebih dari separuh panjang biopsi (sirosis mikronodular)	6

### 3.7 Cara Pengumpulan Data

#### 3.7.1 Alat

- 1) Kandang hewan coba
- 2) Timbangan duduk dan timbangan neraca
- 3) Sonde lambung
- 4) Alat bedah hewan percobaan : pinset, scalpel, gunting, jarum, dan meja lilin
- 5) Alat untuk pembuatan preparat histologi : mikrotom, oven, dan cetakan parafin
- 6) Alat untuk melihat gambaran histopatologi hepar : *deck glass*, *object glass*, mikroskop cahaya
- 7) Gelas ukur dan pengaduk
- 8) Pemanas dan alat pemotong
- 9) Spuit 3 ml

### **3.7.2 Bahan**

- 1) Pakan dan minum standar hewan coba
- 2) Tikus strain Wistar jantan
- 3) Bahan pembuatan preparat histologi dengan pengecatan Masson's Trichrome
  - a. Larutan buffer formalin 10%
  - b. Parafin
  - c. Larutan xylol
  - d. Alkohol bertingkat : 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%
  - e. Aquades
  - f. Etil alkohol
- 4) Dietilnitrosamin
- 5) Ekstrak daun sukun
- 6) Madu

### **3.7.3 Jenis data**

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini merupakan data primer yang diperoleh langsung dari subjek penelitian. Data primer yang dikumpulkan adalah data yang berasal dari pemeriksaan mikroskopis organ hepar tikus Wistar jantan.

### **3.7.4 Cara Kerja Penelitian**

Cara kerja dalam penelitian meliputi langkah-langkah sebagai berikut :

- 1) Sampel diadaptasikan selama satu minggu di laboratorium dan diberi pakan standar.
- 2) Sampel dipilih berdasarkan *simple random sampling*, 24 ekor tikus strain wistra jantan dibagi 4 kelompok. Masing-masing tikus dikandangan secara individual.
- 3) Persiapan DEN dengan dosis 50mg/kgBB
- 4) Persiapan ekstrak daun sukun dengan dosis 200mg/kgBB
- 5) Persiapan madu dengan dosis 2g/kgBB
- 6) Kelompok kontrol positif, tikus Wistar jantan diberi pakan standar secara *ad libitum* kemudian diberikan DEN dengan dosis 50mg/kgBB secara intraperitoneal selama 56 hari berturut-turut.
- 7) Kelompok kontrol negatif, tikus Wistar jantan diberi pakan standar secara *ad libitum* selama 56 hari berturut-turut.
- 8) Memberi perlakuan pada tiap kelompok, yaitu
  - a. Kelompok P1 : Kelompok perlakuan I, berupa pemberian DEN dengan dosis 50mg/kgBB secara intraperitoneal. Setelah 60 menit diberikan ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dengan dosis 200mg/kgBB menggunakan sonde lambung.
  - b. Kelompok P2 : Kelompok perlakuan II, berupa pemberian DEN dengan dosis 50mg/kgBB secara intraperitoneal. Setelah 60 menit diberikan ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dengan dosis 200mg/kgBB yang ditambah madu dengan dosis 2g/kgBB.
- 9) Pada hari ke 57 setelah perlakuan selesai diberikan, semua hewan percobaan dikorbankan dengan dibius terlebih dahulu menggunakan etil alkohol

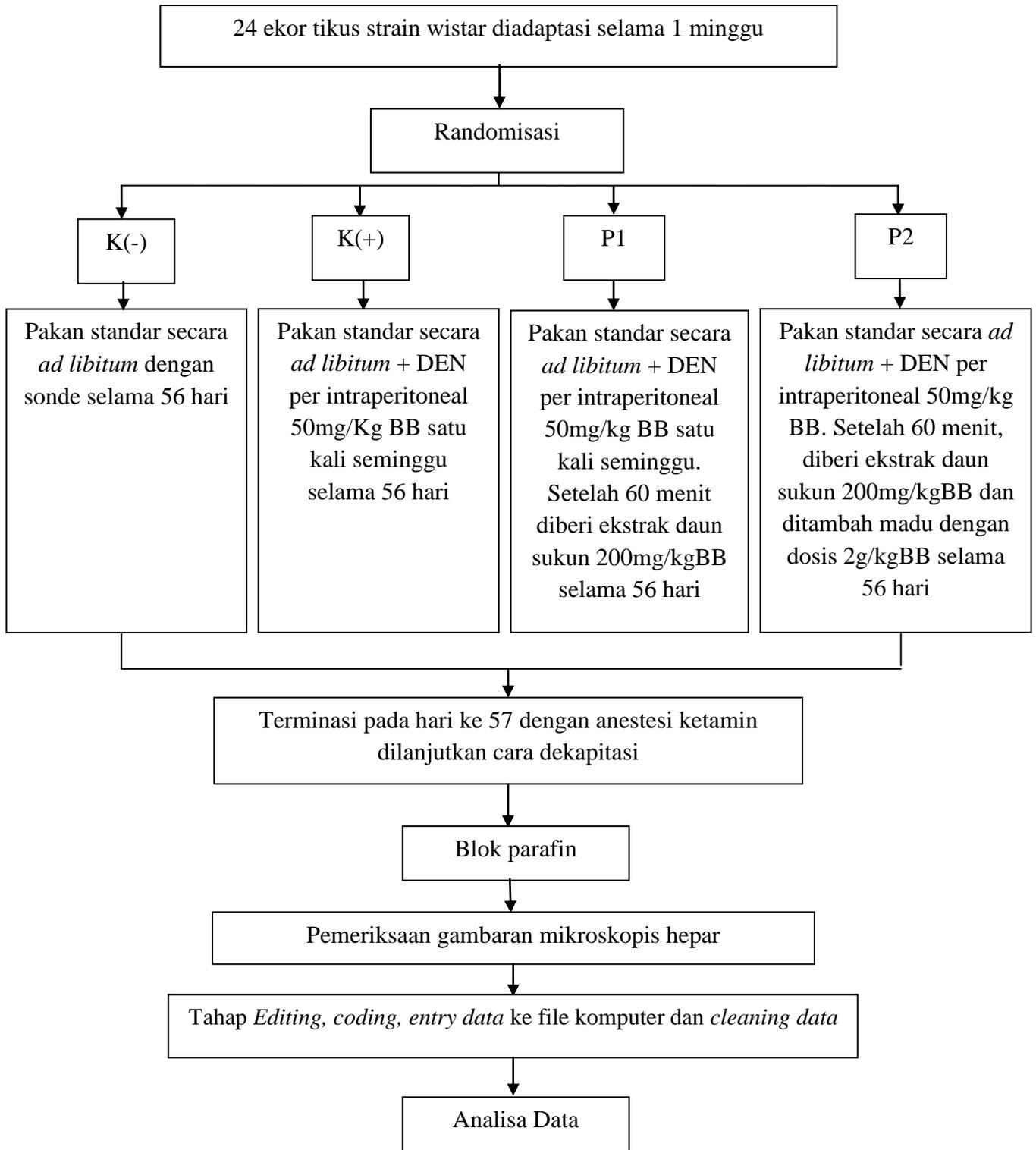
kemudian dilanjutkan dengan cara dekapitasi, kemudian organ hepar diambil untuk selanjutnya dibuat preparat histologi dengan pengecatan *Masson's trichrome* (MT).

10) Pemeriksaan histopatologi jaringan hepar meliputi *processing* dengan pengambilan jaringan dan fiksasi, pemotongan blok, dan pengecatan *Masson's trichrome* (MT).

11) Kriteria penilaian gambaran histopatologis hepar yang digunakan adalah dengan penilaian derajat fibrosis menggunakan system penilaian *Laennec Scoring System*.

Pada hari ke 57 setelah selesai pemberian perlakuan, semua hewan percobaan diterminasi dengan cara anestesi menggunakan ketamin. Organ hepar diambil dan direndam dalam formalin 10%. Hepar dikirim ke bagian Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi Undip untuk dilakukan proses blok parafin. Blok parafin dipotong dan dilakukan pengecatan menggunakan pengecatan *Masson's trichrome* (MT). Pengecatan MT umum digunakan untuk pemeriksaan derajat fibrosis hepar sebab pengecatan MT memberikan gambaran fibrosis stadium awal ataupun stadium akhir dengan baik. Pengecatan MT juga dapat membedakan gambaran fibrosis dan nekrosis, dengan gambaran nekrosis tampak lebih pucat dibandingkan gambaran septa fibrosa yang tampak lebih padat.

### 3.8 Alur Penelitian



**Gambar 8.** Alur Penelitian

### 3.9 Analisis Data

Data yang terkumpul telah diolah terlebih dahulu melalui proses *editing*, *coding*, *entrying*, dan *cleaning* data, lalu data dianalisis secara statistic dengan program SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) 21.0 for Windows. Analisis deskriptif hasil penelitian berupa proporsi untuk masing-masing kelompok. Uji hipotesis yang digunakan adalah uji *Kruskall-wallis* karena kelompok- kelompok pengukuran dalam penelitian ini tidak berpasangan dan berjumlah lebih dari 2 kelompok, serta variabel-variabel dalam penelitian ini berskala kategorikal. Jika hasil uji *Kruskall-wallis* bermakna, maka akan dilanjutkan uji *Mann-Whitney*. Nilai  $p$  dianggap bermakna apabila  $p < 0,05$  dengan 95% interval kepercayaan.

### 3.10 Etika Penelitian

Sebelum dilakukannya penelitian terhadap hewan coba tikus Wistar pada percobaan ini, maka terlebih dahulu telah dimintakan perihal *Ethical Clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP dr Kariadi, Semarang dengan No. 28 /EC/H/FK-RSDK/2017.