

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Ruang lingkup penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian di bidang Ilmu Farmakologi, Farmasi dan Patologi Anatomi.

#### **4.2. Tempat dan waktu penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di 2 tempat, yaitu Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang (UNNES) untuk pengandangan, pemberian pakan, dan perlakuan hewan coba serta Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNDIP untuk pembuatan dan pembacaan preparat histopatologi hepar. Penelitian dan pengumpulan data pada penelitian ini akan dilaksanakan dari bulan Maret-Juli tahun 2013.

#### **4.3. Jenis dan rancangan penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan *post test only controlled group design*. Perlakuan yang diberikan adalah dengan memberikan jus kubis, sedangkan luaran (*outcome*) adalah gambaran makroskopis dan mikroskopis hepar pada tikus wistar jantan yang diberikan diet kuning telur.

#### 4.4. Populasi dan sampel

##### 4.4.1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan. Sampel populasi penelitian didapatkan dari Laboratorium Biologi Fakultas MIPA UNNES.

##### 4.4.2. Sampel Penelitian

###### 4.4.2.1. Kriteria Inklusi

- 1) Tikus galur wistar jantan
- 2) Usia 8-12 minggu
- 3) Berat badan 180-200 gram
- 4) Sehat atau tidak cacat, tingkah laku dan aktivitas tikus normal

###### 4.4.2.2. Kriteria eksklusi

- 1) Berat badan tikus menurun (<160 gram) selama masa adaptasi
- 2) Tikus mati selama masa adaptasi

##### 4.4.3. Cara Sampling

Metode pemilihan sampel menggunakan *simple random sampling*.

##### 4.4.4. Besar Sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria *World Health Organization* (WHO) yang digunakan untuk penelitian dan evaluasi obat tradisional, yaitu tikus jantan minimal 5 ekor untuk masing-masing kelompok.<sup>27</sup> Penelitian ini membagi sampel menjadi 4 kelompok, sehingga jumlah tikus total adalah 20 ekor. Masing-masing kelompok ditambah satu ekor tikus, jadi total besar sampel terdapat 24 ekor tikus. Apabila terdapat tikus yang termasuk dalam kriteria eksklusi, diganti dengan tikus lain yang

termasuk dalam kriteria inklusi sehingga jumlah tikus tetap sesuai dengan yang diinginkan.

#### **4.5. Variabel penelitian**

##### 4.5.1. Variabel bebas

Jus kubis merupakan variabel bebas pada penelitian ini.

##### 4.5.2. Variabel tergantung

Gambaran makroskopis dan mikroskopis hepar tikus wistar jantan yang diberikan diet kuning telur.

#### 4.6. Definisi operasional

**Tabel 3.** Definisi operasional variabel

No	Variabel	Unit	Skala												
1.	<p>Jus kubis</p> <p>Jus yang dibuat dari bahan dasar kubis (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.) seberat 50 gram dipotong terlebih dahulu, kemudian tanpa penambahan air dijus dengan alat <i>juice extractor</i> menghasilkan 25 cc. Diberikan peroral menggunakan sonde lambung kepada kelompok perlakuan, dimana pada kelompok perlakuan 1 sebesar 2,5 ml; kelompok perlakuan 2 sebesar 3,75 ml; kelompok perlakuan 3 sebesar 5 ml. Pemberian dilakukan dalam dua kali pemberian dengan selang waktu satu jam disesuaikan dengan waktu pengosongan lambung tikus, dengan pembagian sebagai berikut:</p> <p><b>Tabel 4.</b> Pembagian dosis jus kubis</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Kelompok</th> <th>Pemberian pertama</th> <th>Setelah 1 jam</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Kelompok perlakuan 1</td> <td>1,3 ml</td> <td>1,2 ml</td> </tr> <tr> <td>Kelompok perlakuan 2</td> <td>1,9 ml</td> <td>1,85 ml</td> </tr> <tr> <td>Kelompok perlakuan 3</td> <td>2,5 ml</td> <td>2,5 ml</td> </tr> </tbody> </table>	Kelompok	Pemberian pertama	Setelah 1 jam	Kelompok perlakuan 1	1,3 ml	1,2 ml	Kelompok perlakuan 2	1,9 ml	1,85 ml	Kelompok perlakuan 3	2,5 ml	2,5 ml	ml	Rasio
Kelompok	Pemberian pertama	Setelah 1 jam													
Kelompok perlakuan 1	1,3 ml	1,2 ml													
Kelompok perlakuan 2	1,9 ml	1,85 ml													
Kelompok perlakuan 3	2,5 ml	2,5 ml													
2.	<p>Tikus yang diinduksi kuning telur ayam</p> <p>Tikus jantan galur wistar umur sekitar 8-12 minggu setelah dilakukan pemberian diet kuning telur ayam selama 14 hari. Induksi kuning telur ayam adalah sebesar 3,5 cc dengan pemberian dilakukan dua kali dalam selang waktu satu jam, yaitu 1,8 ml untuk pemberian pertama dan 1,7 ml untuk pemberian setelah satu jam. Kadar kolesterol total, trigliserida, LDL, HDL, dan rasio HDL/LDL diukur menggunakan metode CHOD-PAP dan GPO-PAP.</p>	Ekor	Nominal												

**Tabel 3.** Definisi operasional (lanjutan)

No.	Variabel	Unit	Skala												
3	<p>Gambaran makroskopis hepar</p> <p>Penilaian normal diberikan jika permukaan hepar adalah rata dan halus, sedangkan penilaian abnormal diberikan jika terdapat perdarahan, jaringan ikat, kista, abses, atau berbenjol-benjol pada permukaan hepar. Berikut adalah skoring penilaian gambaran makroskopik hepar:</p> <p><b>Tabel 5.</b> Skor penilaian morfologi makroskopik hepar</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Luas daerah</th> <th>Skor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Normal</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Abnormal &lt; 25%</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Abnormal 26-50%</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Abnormal 51-75%</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Abnormal 76-100%</td> <td>4</td> </tr> </tbody> </table>	Luas daerah	Skor	Normal	0	Abnormal < 25%	1	Abnormal 26-50%	2	Abnormal 51-75%	3	Abnormal 76-100%	4		Ordinal
Luas daerah	Skor														
Normal	0														
Abnormal < 25%	1														
Abnormal 26-50%	2														
Abnormal 51-75%	3														
Abnormal 76-100%	4														
4	<p>Gambaran mikroskopis hepar</p> <p>Setelah selesai dilakukan pengamatan terhadap permukaan hepar, dibuat preparat dengan pewarnaan <i>Hematoxilin Eosin</i> (HE). Pengamatan dilakukan dengan menggunakan skoring derajat histopatologi hepar berdasarkan penilaian menurut kriteria <i>Manja Roenigk</i>.<sup>28</sup></p> <p>Penilaian derajat perubahan struktur histopatologi hepar menurut kriteria sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Normal: sel berbentuk poligonal, sitoplasma berwarna merah homogen dengan dinding sel berbatas tegas.</li> <li>2) Degenerasi parenkimatosal/albuminosa: sitoplasma sel tampak keruh karena terdapat endapan protein</li> <li>3) Degenerasi hidropik: pada sitoplasma maupun di sekeliling inti sel tampak adanya vakuola.</li> <li>4) Nekrosis: inti sel piknotik dan sitoplasmanya menggumpal.</li> </ol> <p><b>Tabel 5.</b> Skor penilaian derajat histologi sel hepar</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Tingkat perubahan</th> <th>Skor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Normal</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Degenerasi albuminosa</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Degenerasi hidropik</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Nekrosis</td> <td>4</td> </tr> </tbody> </table> <p>Preparat yang telah dibuat diamati di bawah mikroskop cahaya dalam lima lapangan pandang yang berbeda, dengan pembesaran 400 kali. Setiap lapangan pandang diperiksa sebanyak 40 sel kemudian dinilai skor untuk setiap sel. Setelah itu, dihitung rerata nilai skor histopatologi masing-masing hepar tikus.</p>	Tingkat perubahan	Skor	Normal	1	Degenerasi albuminosa	2	Degenerasi hidropik	3	Nekrosis	4		Rasio		
Tingkat perubahan	Skor														
Normal	1														
Degenerasi albuminosa	2														
Degenerasi hidropik	3														
Nekrosis	4														

## 4.7. Cara pengumpulan bahan

### 4.7.1. Bahan

- 1) Kubis (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)
- 2) Pakan dan minum standar tikus
- 3) Kuning telur ayam

### 4.7.2. Alat

- 1) Kandang untuk hewan coba
- 2) Sonde lambung
- 3) Timbangan
- 4) Mikroskop
- 5) *Object glass*
- 6) Scalpel
- 7) *Juice extractor*

### 4.7.3. Jenis data

Gambaran makroskopis dan mikroskopis hepar tikus wistar jantan yang diberikan diet kuning telur setelah pemberian jus kubis merupakan data primer.

### 4.7.4. Cara kerja

- 1) Cara pembuatan jus kubis

Kubis (*Brassica Oleracea* var *Capitata* L.) segar seberat 50 gram dipotong kemudian dijus dengan menggunakan alat *juice extractor* tanpa penambahan air menghasilkan 25 cc. Jus tersebut diberikan secara oral

melalui sonde lambung dalam dosis yang bertingkat yaitu 2,5 ml; 3,75ml; dan 5ml.

2) Cara pembuatan diet kuning telur ayam

Kuning telur yang sebelumnya telah dipisahkan dari putih telurnya, dibuat emulsi dengan cara mengocok perlahan. Emulsi kuning telur tersebut kemudian ditimbang, diet kuning telur ditentukan sebesar 3-4% berat badan tikus atau sekitar 5 gram (3,5 cc), diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung selama 14 hari.<sup>29</sup>

3) Pemeliharaan dan pemberian pakan hewan coba

Sebelum diberi perlakuan, seluruh sampel diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari, diberi pakan standar dan minum *ad libitum*. Setelah itu, sampel diberi pakan standar dan pakan tinggi kolesterol selama 14 hari. Kemudian seluruh sampel diukur kadar kolesterol darahnya untuk mengetahui kadar dari profil lipidnya. Sampel dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing 6 ekor tikus yaitu kelompok kontrol yang diberi pakan standar dan diet kuning telur, kemudian kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 yang diberi pakan standar, diet kuning telur, serta jus kubis selama 14 hari untuk kemudian semua tikus dimatikan dan selanjutnya diambil heparnya dan dilakukan pemeriksaan gambaran makroskopis dan mikroskopisnya kemudian dilakukan pencatatan.

Dosis anjuran konsumsi kubis pada laki-laki dewasa selama satu hari yaitu sekitar 315-455 gram. Dosis yang diberikan merupakan hasil konversi dengan dosis untuk tikus dengan berat badan 200 gram.

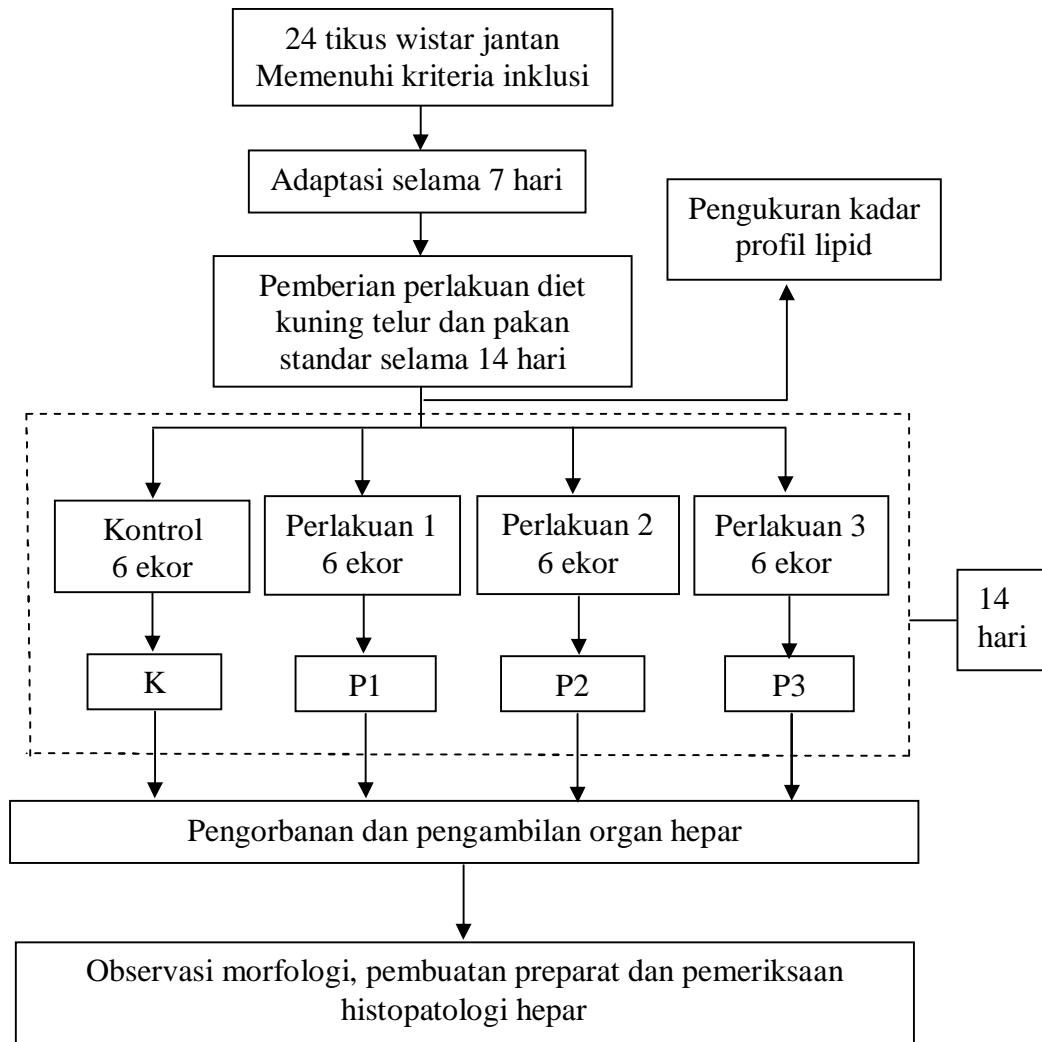
**Tabel 7.** Konversi perhitungan dosis.<sup>30</sup>

	Mencit	Tikus	Marmot	Kelinci	Manusia
Mencit (200 gram)	1,0	7,0	12,25	27,8	387,9
Tikus (200 gram)	0,14	1,0	1,74	3,9	56,0
Marmot (400 gram)	0,08	0,57	1,0	2,25	31,5
Kelinci (1,5 kg)	0,04	0,25	0,44	1,0	14,2
Manusia (70 kg)	0,0026	<b>0,018</b>	0,031	0,07	1,0

Berdasarkan tabel tersebut, konversi dosis dari manusia ke tikus adalah 0,018. Perhitungan dosisnya adalah  $315 \times 0,018 = 5,67$  gram dan  $455 \times 0,018 = 8,19$  gram, sehingga dosis kubis untuk tikus berkisar antara 5,67–8,19 gram. Sedangkan volume maksimal larutan yang dapat diberikan pada tikus secara peroral adalah 5,0 ml/hari, sehingga dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 gram; 7,5 gram; 10 gram yang setara dengan 2,5 ml; 3,75 ml; dan 5ml.<sup>31</sup>



#### 4.8. Alur penelitian



**Gambar 3.** Diagram alur penelitian

Keterangan:

K : Kelompok kontrol (tikus+pakan standar dan minum *ad libitum*+diet kuning telur)

P1 : Kelompok perlakuan 1 (tikus+pakan standar dan minum *ad libitum*+diet kuning telur+jus kubis 2,5 ml/hari)

P2: Kelompok perlakuan 2 (tikus+pakan standar dan minum *ad libitum*+diet kuning telur+jus kubis 3,75 ml/hari)

P3: Kelompok perlakuan 3 (tikus+pakan standar dan minum *ad libitum*+diet kuning telur+jus kubis 5 ml/hari)

#### **4.9. Analisis data**

Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan komputer dan dianalisis secara statistik. Pada data morfologi makroskopis, dilakukan uji analisis statistik menggunakan uji *Chi-Square* terlebih dahulu dan didapatkan bahwa data tidak memenuhi syarat uji *Chi-Square* sehingga uji dilanjutkan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*, didapatkan nilai  $p > 0,05$  yang berarti tidak didapatkan perbedaan yang bermakna. Pada data mikroskopis, dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan sebaran data yang normal. Pada uji homogenitas data didapatkan data yang homogen. Data kemudian diuji menggunakan uji parametrik *One Way Anova*, didapatkan nilai  $p < 0,05$  dan dilanjutkan dengan menggunakan analisis *post hoc*.

#### **4.10. Etika penelitian**

*Ethical clearance* diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang atau RSUP Dr. Kariadi Semarang pada tanggal 29 April 2013 dengan No. 116/EC/FK/RSDK/2013.

Pada penelitian ini hewan dipelihara di laboratorium secara berkelompok dan diberi diet kuning telur ayam dan ransum pakan standar serta minum *ad libitum*. Perlakuan jus kubis diberikan dengan cara sonde lambung dalam dosis bertingkat. Hewan dibunuh dengan cara anestesi menggunakan ether, kemudian tikus dibedah untuk diambil organ hepar untuk dibuat preparat sesuai metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan.