

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Ruang Lingkup Penelitian**

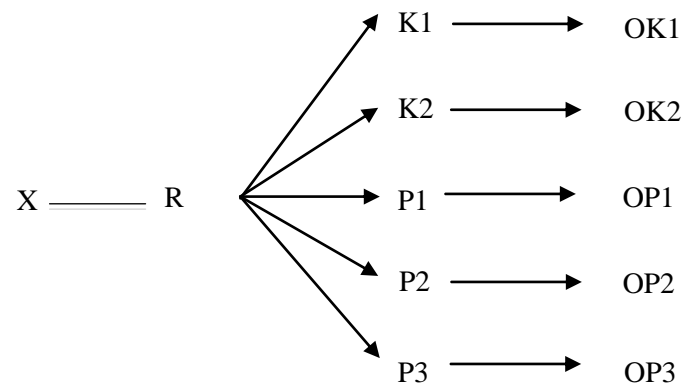
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Ilmu Farmakologi dan Kardiologi.

#### **4.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di 3 tempat, yaitu di LPPT (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu) UGM Yogyakarta untuk ekstraksi kunyit, Laboratorium Parasitologi Universitas Diponegoro Semarang untuk pengandangan dan perlakuan hewan coba, Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi untuk analisis fibrosis miokard. Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal.

#### **4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni dan rancangan yang dipakai adalah *Post Test Only Control Group Design* yaitu dengan cara membandingkan hasil observasi pada kelompok kontrol dan perlakuan setelah diberi tindakan.



**Gambar 3.** Rancangan Penelitian

Keterangan :

X \_\_R : Masa adaptasi

R : Randomisasi

K1 : Kontrol 1

Kelompok mencit yang diberi air minum *ad libitum*

K2 : Kontrol 2

Kelompok mencit yang diberi *streptozotocin*

P1 : Perlakuan 1

Kelompok mencit yang diberi *streptozotocin* dan ekstrak kunyit

P2 : Perlakuan 2

Kelompok mencit yang diberi *streptozotocin* dan *exercise training*

P3 : Perlakuan 3

Kelompok mencit yang diberi *streptozotocin*, ekstrak kunyit, dan *exercise training*

OK1 : Pengamatan pada kelompok Kontrol 1

OK2 : Pengamatan pada kelompok Kontrol 2

OP1 : Pengamatan pada kelompok Perlakuan 1

OP2 : Pengamatan pada kelompok Perlakuan 2

OP3 : Pengamatan pada kelompok Perlakuan 3

#### **4.4 Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **4.4.1 Populasi**

Populasi penelitian ini adalah mencit Swiss yang dikembangkan di Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang.

##### **4.4.2 Sampel**

###### **4.4.2.1 Kriteria Inklusi**

Kriteria inklusi dari penelitian ini adalah mencit Swiss jantan, umur 3 bulan, berat badan 25 – 35 gram, kondisi sehat, dan tidak tampak kelainan anatomis maupun fisiologis.

###### **4.4.2.2 Kriteria Eksklusi**

Kriteria eksklusi dari penelitian ini adalah mencit Swiss mati sebelum tiba waktu observasi dan mencit tidak menderita diabetes melitus setelah injeksi *streptozotocin*.

##### **4.4.3 Cara Sampling**

Pengambilan sampel dilakukan secara acak (*simple random sampling*) untuk menghindari bias. Dengan cara ini semua objek atau elemen populasi memiliki kesempatan yang sama sebagai sampel.

#### **4.4.4 Besar Sampel**

Besar sampel berdasarkan kriteria WHO untuk penelitian dengan mempergunakan herbal adalah lima ekor per-kelompok perlakuan.<sup>30</sup> Pada penelitian ini terdapat lima kelompok perlakuan. Pada setiap kelompok digunakan lima ekor mencit, dua ekor masing-masing sebagai cadangan, sehingga jumlah total mencit adalah 35 ekor mencit. Masing-masing kelompok dimasukkan dalam satu kandang dengan diberi makan standart dan minum *ad libitum*.

#### **4.5 Variabel Penelitian**

##### **4.5.1 Variabel Bebas (Independen)**

Variabel bebas adalah pemberian ekstrak kunyit dan *exercise training*.

##### **4.5.2 Variabel Tergantung (Dependen)**

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah fibrosis miokard. Area fibrosis miokard diukur dengan *color image analyzer* (Image J, *National Institute of Health* – USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij>), menggunakan perbedaan warna (biru pada area fibrosis dibanding merah pada miokard).

## 4.6 Definisi Operasional

**Tabel 2.** Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
Mencit dengan diabetes melitus yang diinduksi dengan <i>streptozotocin</i>	Mencit Swiss jantan berusia 3 bulan dengan berat 25-35 g yang pada hari ke 3 setelah injeksi intraperitoneal <i>streptozotocin</i> dengan dosis 180 mg/kg bb dalam larutan PBS pH 4.5 memiliki glukosa darah puasa $\geq 17$ mmol/L atau 306 mg/dl	ekor	Nominal
Ekstrak kunyit	Rimpang kunyit diperoleh dari pasar tradisional. Proses ekstraksi dilakukan melalui metode maserasi dengan pelarut etanol. Ekstrak kunyit yang diperoleh adalah 2.879% dari berat awal rimpang kunyit. Pemberian dilakukan secara per oral dengan pelarut CMC pada dosis 3 mg/hari	mg	Nominal
Exercise Training	Exercise training dilakukan dengan renang pada suhu air 30-32°C selama 6 hari/minggu. Dalam 1 hari terdapat 2 sesi renang dengan durasi waktu 15 menit pada awal perlakuan dan meningkat 15 menit tiap hari sampai tercapai durasi maksimum yaitu 60 menit per sesi.	menit	Nominal
Fibrosis miokard	Fibrosis miokard diamati dari jaringan miokard mencit yang tercatat biru dengan pengecatan Masson's Trichrome. Tingkat fibrosis diukur dari rasio antara area miokard yang mengalami fibrosis dibanding seluruh area miokard		Rasio

## 4.7 Cara Pengumpulan Data

### 4.7.1 Bahan

1. *Streptozotocin*

2. *Phosphate buffer saline* (PBS) pH 4.5
3. Ekstrak kunyit
4. Pakan dan minum standar mencit
5. Buffer formalin 4%
6. Masson's Trichrome kit

#### **4.7.2 Alat**

1. Kandang hewan coba
2. Timbangan
3. Sonde lambung
4. Pipet ukur
5. Tabung reaksi
6. Batang pengaduk
7. Spatula
8. Inkubator
9. Beaker glass
10. Alat test glukosa darah (Accu-Chek)

#### **4.7.3 Jenis Data**

Pemeriksaan fibrosis miokard setelah pemberian ekstrak kunyit dan *exercise training* merupakan data primer.

#### 4.7.4 Cara Kerja

##### 1) Perhitungan dosis ekstrak kunyit

**Tabel 3.** Konversi dosis manusia dan antar jenis hewan<sup>31</sup>

	Mencit	Tikus	Marmot	Manusia
Mencit (200 g)	1,0	7,0	12,25	387,9
Tikus (200g)	0,14	1,0	1,74	56,0
Marmot (400g)	0,08	0,57	1,0	31,15
Manusia (70kg)	0,0026	0,018	0,031	1,0

Dosis pemberian didasarkan pada penelitian sebelumnya untuk ekstrak kunyit bagi tikus adalah 100 mg/kg/hari,<sup>32</sup> dengan asumsi tikus memiliki berat badan 200 g maka akan diberikan ekstrak kunyit sebanyak 20 mg/hari. Kemudian dosis ini dikonversi dengan dosis untuk mencit. Berdasarkan tabel 3, konversi dosis dari tikus ke mencit adalah 0,14. Perhitungan dosisnya adalah  $20 \times 0,14 = 2,8 \approx 3$  mg/hari.

##### 2) Perlakuan terhadap hewan coba

1. 35 ekor mencit stain Swiss berumur tiga bulan diadaptasikan selama tujuh hari di laboratorium di dalam kandang dan diberi pakan standar dan minum *ad libitum*.
2. Setelah diadaptasikan, mencit-mencit tersebut dibagi menjadi lima kelompok secara acak dan dikandangkan per-kelompok.
3. Kelompok K1 : tujuh mencit ditimbang berat badan, diukur glukosa darah melalui vena ekor, dan diinjeksikan dengan PBS pH 4.5 secara

intraperitoneal pada hari ke-0. Mencit mendapatkan pakan standar dan minum. Pada hari ke-3 dilakukan pemeriksaan glukosa darah. Pada hari ke-21 dilakukan *simple random sampling* untuk menentukan 5 sampel yang ditimbang berat badan, diukur glukosa darah, dan diterminasi untuk mengambil sampel miokard. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan Masson's Trichrome.

4. Kelompok K2 : tujuh mencit ditimbang berat badan, diukur glukosa darah melalui vena ekor, dan diinjeksikan dengan *streptozotocin* dalam PBS pH 4.5 secara intraperitoneal pada hari ke-0. Mencit mendapatkan pakan standar dan minum. Pada hari ke-3 dilakukan pemeriksaan glukosa darah untuk memastikan mencit mengalami diabetes. Pada hari ke-21 dilakukan *simple random sampling* untuk menentukan 5 sampel ditimbang yang berat badan, diukur glukosa darah, dan diterminasi untuk mengambil sampel miokard. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan Masson's Trichrome.
5. Kelompok P1 : tujuh mencit ditimbang berat badan, diukur glukosa darah melalui vena ekor, dan diinjeksikan dengan *streptozotocin* dalam PBS pH 4.5 secara intraperitoneal pada hari ke-0. Mencit mendapatkan pakan standar dan minum. Pada hari ke-3 dilakukan pemeriksaan glukosa darah untuk memastikan mencit mengalami diabetes. Pada hari ke-4 sampai hari ke-21 mencit diberikan ekstrak kunyit per oral dengan dosis 3mg/hari. Pada hari ke-21 dilakukan *simple random sampling* untuk menentukan 5 sampel yang ditimbang berat badan,



diukur glukosa darah, dan diterminasi untuk mengambil sampel miokard. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan Masson's Trichrome.

6. Kelompok P2 : tujuh mencit ditimbang berat badan, diukur glukosa darah melalui vena ekor, dan diinjeksikan dengan *streptozotocin* dalam PBS pH 4.5 secara intraperitoneal pada hari ke-0. Mencit mendapatkan pakan standar dan minum. Pada hari ke-3 dilakukan pemeriksaan glukosa darah untuk memastikan mencit mengalami diabetes. Pada hari ke-4 sampai hari ke-21 mencit diberikan *exercise training* selama 6 hari/minggu. Pada hari ke-21 dilakukan *simple random sampling* untuk menentukan 5 sampel yang ditimbang berat badan, diukur glukosa darah, dan diterminasi untuk mengambil sampel miokard. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan Masson's Trichrome.
7. Kelompok P3 : tujuh mencit ditimbang berat badan, diukur glukosa darah melalui vena ekor, dan diinjeksikan dengan *streptozotocin* dalam PBS pH 4.5 secara intraperitoneal pada hari ke-0. Mencit mendapatkan pakan standar dan minum. Pada hari ke-3 dilakukan pemeriksaan glukosa darah melalui vena ekor untuk memastikan mencit mengalami diabetes. Pada hari ke-4 sampai hari ke-21 mencit diberikan ekstrak kunyit per oral dengan dosis 3mg/hari dan *exercise training* selama 6 hari/minggu. Pada hari ke-21 dilakukan *simple random sampling* untuk menentukan 5 sampel yang ditimbang berat badan, diukur glukosa

darah, dan diterminasi untuk mengambil sampel miokard. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan Masson's Trichrome.

### **3) Pengambilan sampel miokard<sup>33</sup>**

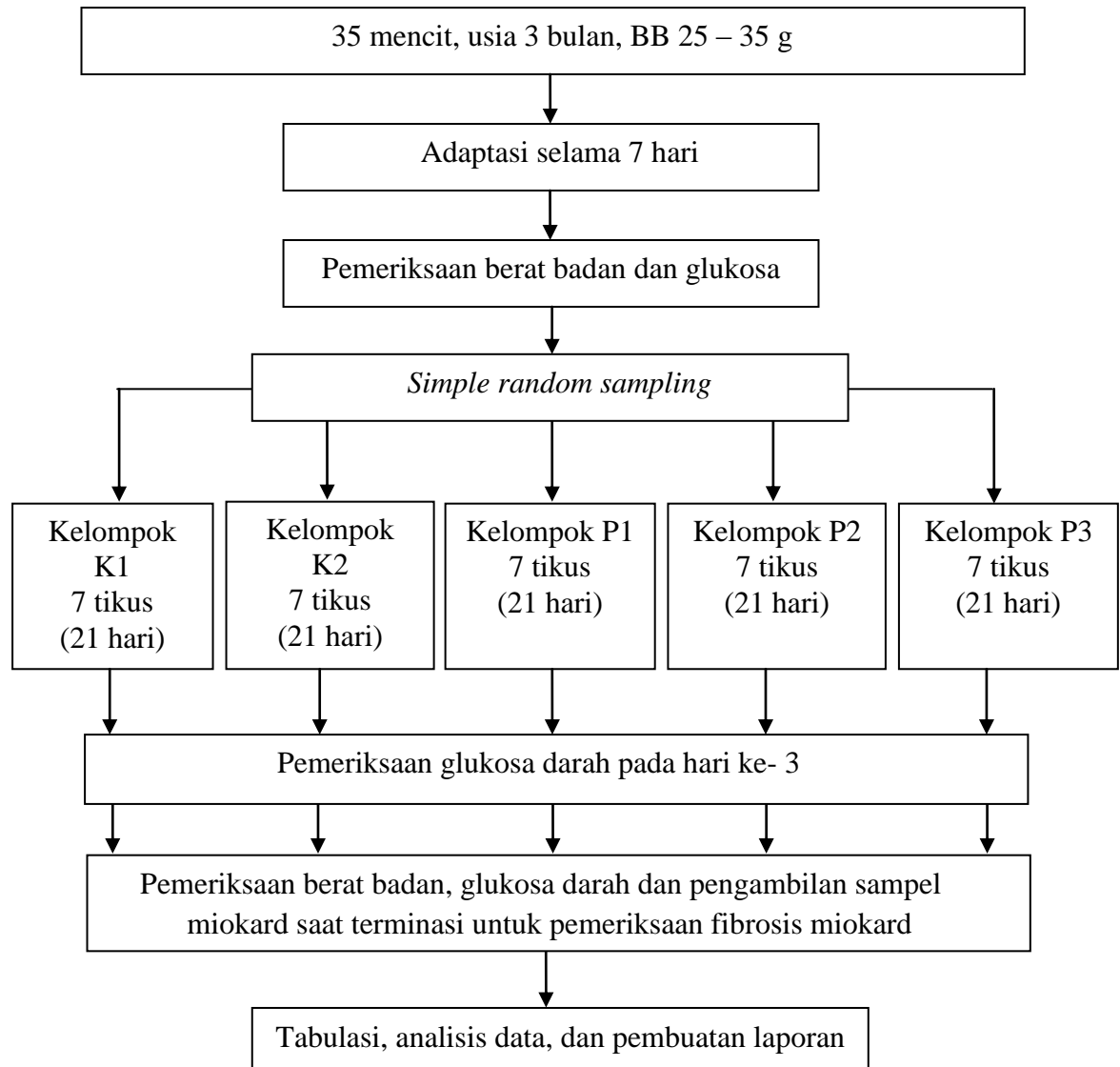
1. Mencit Swiss diterminasi dengan dislokasi cervix, dibaringkan telentang dan seluruh permukaan ventral disiram ethanol 70%.
2. Abdomen mencit diiris pada tempat dimana processus xiphoideus dari sternum ditemukan.
3. Diafragma mencit dipotong.
4. Thoraks dibuka dengan mengiris bagian kanan dari sternum, kemudian dipindahkan ke kiri dan difiksasi dengan klem.
5. Organ jantung dengan cepat dikeluarkan dan dibersihkan dengan larutan fisiologis.
6. Organ jantung yang sudah dibersihkan lalu direndam di larutan buffer formalin untuk dibuat *slide*.
7. Organ jantung dipotong secara parallel dengan cincin atrioventricular sehingga memiliki ketebalan 2 mm
8. Potongan organ jantung tersebut diblok parafin dan dipotong lebih lanjut sehingga menjadi slides yang memiliki ketebalan 4  $\mu\text{m}$  dan kemudian dicat dengan hematoxylin-eosin (HE)

### **4) Pengecatan Masson's Trichrome<sup>34</sup>**

1. Slide di-deparafinasi dan rehidrasi dengan 100% alkohol, 95% alcohol, 70 % alkohol
2. Slide dicuci dengan Aquades

3. Untuk jaringan yang difiksasi dengan formalin, refiksasi dengan larutan Bouin's selama 1 jam pada suhu 56°C untuk meningkatkan kualitas pengecatan walaupun langkah ini tidak harus dilakukan.
4. Slide direndam dengan air mengalir selama 5 – 10 menit untuk menghilangkan warna kuning
5. Slide dicat dengan larutan kerja *Weigert's iron hematoxylin* selama 10 menit
6. Slide direndam dengan air mengalir yang hangat selama 10 menit
7. Slide dicuci dengan Aquades
8. Slide dicat dengan larutan *Biebrich scarlet-acid fuchsin* selama 10 – 15 menit
9. Slide dicuci dengan Aquades
10. Slide didiferensiasi dengan larutan *phosphomolybdic-phosphotungstic acid* selama 10 – 15 menit atau sampai warna kolagen tidak merah
11. Slide langsung dicat (tanpa direndam) dengan larutan Anilin Blue selama 5 – 10 menit. Slide direndam sesaat di Aquades dan didiferensiasi dengan larutan asam asetat 1% selama 2 – 5 menit.
12. Slide dicuci dengan Aquades
13. Slide di-dehidarasi dengan cepat menggunakan etil alkohol 95%, etil alkohol absolut (langkah ini akan menghilangkan cat *Biebrich scarlet-acid fuchsin*) dan slide dibersihkan dengan *xylene*
14. Slide ditaruh di atas medium yang memiliki resin

## 4.8 Alur Penelitian



**Gambar 4.** Diagram Alur Penelitian

## 4.9 Pengolahan dan Analisis Data

### 4.9.1 Pengolahan Data

#### 4.9.1.1 Cleaning

Pada data penelitian dilakukan pembersihan data. Data diteliti dahulu agar tidak terdapat data yang tidak diperlukan.

#### **4.9.1.2 Editing**

Editing dilakukan untuk meneliti kelengkapan data, kesinambungan data, dan keseragaman data sehingga validitas data terjamin.

#### **4.9.1.3 Coding**

Coding dilakukan untuk memudahkan dalam pengolahan data termasuk pemberian skor.

#### **4.9.1.4 Entrying**

Entrying data adalah memasukan data dalam komputer untuk dilakukan proses analisa data.

#### **4.9.2 Analisis Data**

Setelah data di-edit, di-coding, dan di-entry, data dianalisis statistik dan deskriptif. Analisis statistik dalam penelitian ini menggunakan program SPSS 16.00 for Windows. Dalam analisis deskriptif dihitung kecenderungan sentral dan sebaran, dan hasilnya disajikan dalam diagram box-plot sesuai dengan kelompok perlakuan. Setelah itu dinilai normalitas dari variabel dengan uji *Saphiro-Wilk*. Jika distribusi data dinilai normal maka dilakukan uji hipotesis dengan uji *One Way Analysis of Variance (One Way ANOVA)* dilanjutkan uji LSD untuk analisa *post-hoc*. Batas nilai yang dianggap signifikan dalam penelitian adalah jika  $p < 0,05$  dengan interval kepercayaan 95%.

#### 4.10 Etika Penelitian

*Ethical clearance* diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang/RSUP Dr. Kariadi pada tanggal 6 Mei 2013.

#### 4.11 Jadwal Penelitian

Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3				Bulan 4				Bulan 5			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Studi literature	■	■	■	■	■	■	■													
Penyusunan proposal	■	■	■	■	■	■	■													
Seminar proposal							■													
Persiapan peminjaman laboratorium						■	■	■												
Persiapan alat dan bahan						■	■	■	■	■										
Penelitian											■	■	■	■	■	■				
Analisis data																	■	■		
Penulisan laporan																	■	■	■	■
Seminar hasil																				■