

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

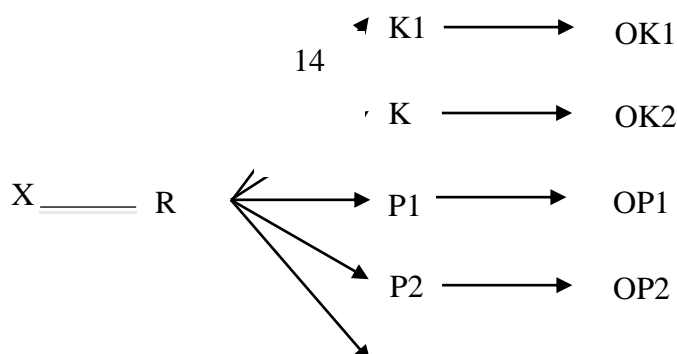
Penelitian ini adalah penelitian dalam bidang Ilmu Farmakologi dan Penyakit Dalam.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di 3 tempat, LPPT UGM untuk ekstraksi kunyit, Laboratorium Parasitologi FK Undip untuk pengandangan dan perlakuan hewan coba, dan Laboratorium Patologi Anatomi RSUP dr Kariadi untuk analisis hipertrofi. Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal.

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini berjenis 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.



P3 → OP3

Gambar 3. Rancangan Penelitian

Keterangan :

X__R : Masa adaptasi

R : Randomisasi

K1 : Kontrol 1

Kelompok mencit yang diberi air minum *ad libitium*

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, Unnes.

4.4.2 Sampel

4.4.2.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dari penelitian ini adalah mencit Swiss, 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 mellitus* 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.⁶⁰ Pada penelitian ini terdapat lima kelompok perlakuan. Pada setiap kelompok digunakan lima ekor mencit, ditambah dua ekor sebagai cadangan, maka 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 hipertrofi miosit yang diukur dengan piranti lunak ImageJ 1.47v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Amerika Serikat, <http://imageJ.nih.gov/ij>). Hipertrofi diukur pada foto dengan total perbesaran 400x.

4.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
Mencit dengan <i>diabetes mellitus</i> 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/kgBB dalam larutan sitrat buffer pH 4.5 memiliki glukosa darah puasa ≥ 17 mmol/L atau 306 mg/dL	ekor	Nominal
Ekstrak kunyit	Rimpang kunyit didapat di pasar tradisional Ekstrak kunyit didapatkan melalui proses ekstraksi metode maserasi dengan pelarut ethanol. Ekstrak kunyit yang diperoleh adalah x persen dari berat awal rimpang kunyit. Pemberian secara peroral 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	menit	Nominal

perlakukan dan meningkat 15 menit tiap hari sampai tercapai durasi maksimum yaitu 60 menit per sesi.

Hipertrofi miosit	Hipertrofi miosit diamati dengan cara mengukur luas penampang sel miokardium pada perbesaran 400x, rerata diambil dari 3 sel dari setiap lapangan pandang dengan 3 lapangan pandang untuk setiap mencit	μm^2	Nominal
-------------------	---	-----------------	---------

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan

1. *Streptozotocin*
2. Phosphate Buffer Saline
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. Alat test glukosa darah (Accu-Chek)

4.7.3 Jenis Data

Pemeriksaan fibrosis sel otot jantung setelah pemberian *curcumin* dan *exercise training* merupakan data primer.

4.7.4 Cara Kerja

1) Perhitungan dosis *curcumin*

Dosis pemberian didasarkan pada penelitian sebelumnya untuk *curcumin* bagi tikus adalah 100 mg/kg/hari,⁶⁰ dengan asumsi tikus memiliki berat badan 200 g maka akan diberikan *curcumin* sebanyak 20 mg/hari. Kemudian dosis ini dikonversi dengan dosis untuk mencit. Berdasarkan tabel di bawah, konversi dosis dari tikus ke mencit adalah 0,14.

Perhitungan dosisnya adalah $20 \times 0,14 = 2,8 \approx 3$ mg/hari

Tabel 3. Konversi dosis manusia dan antar jenis hewan⁷⁶

	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

2) Perlakuan terhadap hewan coba

1. 35 ekor mencit strain 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 Kontrol (K1) : tujuh mencit ditimbang berat badan, diukur gula darah pada vena ekor, dan diinjeksikan dengan PBS. secara intraperitoneal pada hari ke-0. Mencit mendapatkan pakan standar dan minum. Pada hari ke-3 dilakukan pemeriksaan glukosa darah melalui vena ekor. Pada hari ke-21 dilakukan *simple random sampling* untuk menentukan 5 sampel yang ditimbang berat badan, diukur glukosa darah, dan diteterminasi untuk pengambilan sampel sel otot jantung. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan Masson's Trichrome.
4. Kelompok K2 : tujuh mencit ditimbang berat badan, diukur gula darah pada vena ekor, dan diinjeksikan dengan *streptozotocin* dalam PBS. secara intraperitoneal pada hari ke-0. Mencit mendapatkan pakan standar dan minum. Pada hari ke-3 dilakukan pemeriksaan glukosa darah melalui vena ekor. Pada hari ke-21 dilakukan *simple random sampling* untuk menentukan 5 sampel yang ditimbang berat badan, diukur glukosa darah, dan diteterminasi untuk pengambilan sampel sel otot jantung. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan Masson's Trichrome.
5. Kelompok P1 : tujuh mencit ditimbang berat badan, diukur gula darah pada vena ekor, dan diinjeksikan dengan *streptozotocin* dalam PBS. secara intraperitoneal pada hari ke-0. Mencit mendapatkan pakan standar dan minum. Pada hari ke-3 dilakukan pemeriksaan glukosa darah melalui vena ekor. Pada hari ke-4 hingga hari ke-21, mencit diberikan ekstrak kunyit peroral dengan dosis 3 mg/hari. Pada

hari ke-21 dilakukan *simple random sampling* untuk menentukan 5 sampel yang ditimbang berat badan, diukur glukosa darah, dan diteterminasi untuk pengambilan sampel sel otot jantung. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan Masson's Trichrome.

6. Kelompok P2 : tujuh mencit ditimbang berat badan, diukur gula darah pada vena ekor, dan diinjeksikan dengan *streptozotocin* dalam PBS. secara intraperitoneal pada hari ke-0. Mencit mendapatkan pakan standar dan minum. Pada hari ke-3 dilakukan pemeriksaan glukosa darah melalui vena ekor. Pada hari ke-4 hingga ke-21, dilakukan perlakuan *exercise training* berenang selama 1 jam/hari. Pada hari ke-21 dilakukan *simple random sampling* untuk menentukan 5 sampel yang ditimbang berat badan, diukur glukosa darah, dan diteterminasi untuk pengambilan sampel sel otot jantung. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan Masson's Trichrome.
7. Kelompok P3 : tujuh mencit ditimbang berat badan, diukur gula darah pada vena ekor, dan diinjeksikan dengan *streptozotocin* dalam PBS. secara intraperitoneal pada hari ke-0. Mencit mendapatkan pakan standar dan minum. Pada hari ke-3 dilakukan pemeriksaan glukosa darah melalui vena ekor. Pada hari ke-4 hingga ke-21, dilakukan perlakuan *exercise training* berenang dan pemberian ekstrak kunyit selama 1 jam/hari. Pada hari ke-21 dilakukan *simple random sampling* untuk menentukan 5 sampel yang ditimbang berat badan, diukur glukosa darah, dan diteterminasi untuk pengambilan sampel sel otot jantung. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan Masson's Trichrome.

3) Pengambilan sampel sel otot jantung⁶⁷

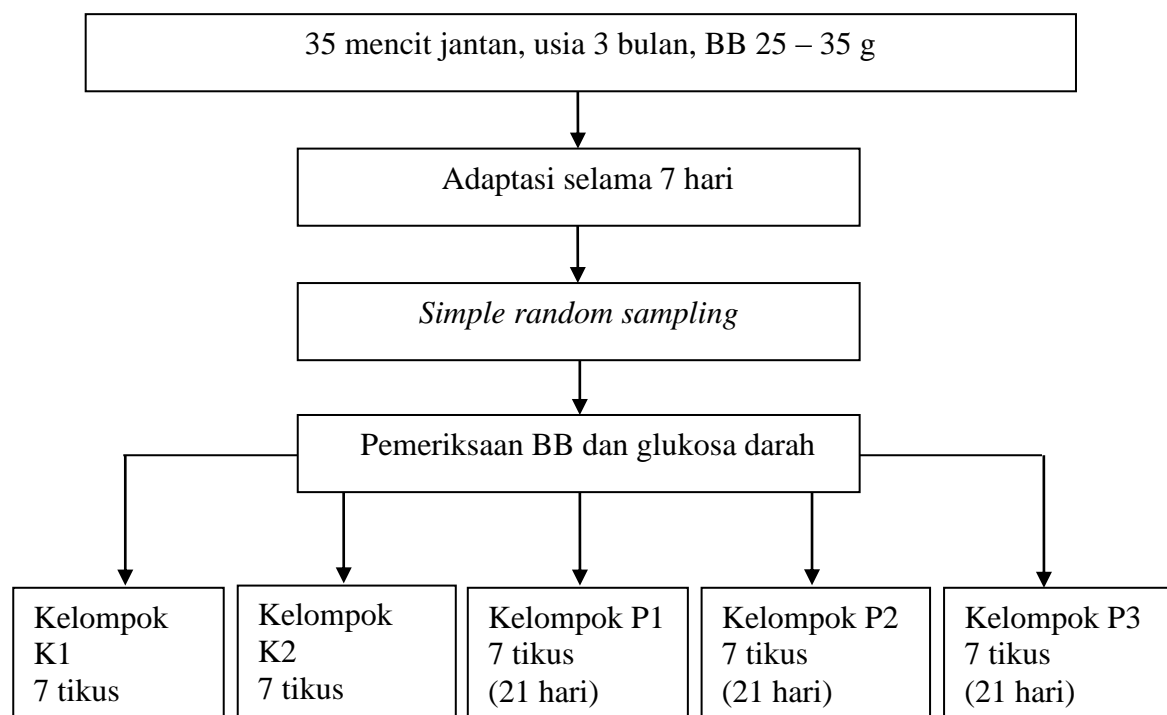
1. Mencit Swiss diterminasi dengan dislokasi cervix, dibaringkan telentang dan seluruh permukaan ventral disiram ethanol 70%.
2. Abdomen mencit diiris pada tempat dimana processus xiphoideus dari sternum ditemukan.
3. Diafragma mencit dipotong.
4. Thoraks dibuka dengan mengiris bagian kanan dari sternum, 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 paralel 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 μ m dan kemudian dicat dengan Mason's Trichrome.

4) Pengecatan Masson's Trichrome⁶⁸

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 didifferensiasi 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 didifferensiasi 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 diletakkan 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 dilanjutkan ke uji hipotesis dengan uji *One Way Analysis of Variance (One Way ANOVA)*, dilanjutkan uji LSD untuk analisis *post-hoc*. Apabila distribusi data dinilai tidak normal maka uji hipotesis dilakukan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. 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/RS. Dr. Kariadi, pada tanggal 4 Juni 2013.

4.11 Jadwal Penelitian

Kegiatan	Januari				Februari				Maret				April				Mei			
	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																				

