

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini meliputi bidang Histologi, Farmakologi, dan Patologi Anatomi.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

- a) Pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- b) Pembuatan preparat dan pemeriksaan mikroskopis hepar hewan coba dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- c) Pemeriksaan kadar asam urat hewan coba dilakukan di Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- d) Penelitian dan pengumpulan data dari Maret 2015 – Juni 2015.

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain yang dipakai adalah *Pre and Post Test Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan 6 kelompok, yaitu tiga kelompok eksperimental dan tiga kelompok kontrol, dengan randomisasi sederhana. Penilaian dilakukan dengan membandingkan hasil observasi pada kelompok eksperimental dan kontrol.

4.4 Populasi dan Sampel

4.4.1 Populasi Target

Mencit Balb/c

4.4.2 Populasi Terjangkau

Mencit Balb/c, jantan, umur 8 minggu, berat badan 20 – 25 gram, sehat, tidak ada kelainan anatomis.

4.4.3 Sampel

4.4.3.1 Kriteria inklusi

- a. Mencit Balb/c
- b. Berat badan 20 – 25 gram
- c. Jantan
- d. Usia 8 minggu
- e. Mencit dalam keadaan sehat
- f. Anatomi tampak normal

4.4.3.2 Kriteria eksklusi

- a. Terdapat kecacatan anatomis selama penelitian
- b. Mati selama adaptasi atau perlakuan

4.4.4 Cara Sampling

Sampling pada penelitian ini dilakukan secara randomisasi.

4.4.5 Besar Sampel

Hewan uji dibagi ke dalam 6 kelompok, dengan jumlah minimal per kelompok mengikuti rumus Federer, yakni

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Dimana: $t = \text{kelompok perlakuan} = 6$

$n = \text{jumlah sampel per kelompok perlakuan}$

Maka: $(t-1)(n-1) \geq 15$

$(6-1)(n-1) \geq 15$

$5n-5 \geq 15$

$n \geq 4 \text{ ekor}$

Namun mengacu pada pedoman WHO mengenai penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental, jumlah sampel mencit yang digunakan dalam tiap kelompok adalah minimal 5 ekor.³³ Pada penelitian ini terdapat 6 kelompok, oleh karena itu diperlukan minimal 30 ekor mencit.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak buah kersen (*Muntingia calabura L.*) dosis bertingkat.

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi hepar mencit Balb/c dan kadar asam urat darah mencit Balb/c.

4.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional variabel

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
Bebas	Ekstrak buah kersen (<i>Muntingia calabura L.</i>) dosis bertingkat	Ekstrak buah kersen (<i>Muntingia calabura L.</i>) dalam bentuk larutan.	Rasio
Tergantung	Kadar Asam Urat	Asam urat merupakan hasil akhir dari metabolisme purin (bentuk turunan nukleoprotein), yaitu salah satu komponen asam nukleat yang terdapat pada inti sel-sel tubuh	Rasio
Tergantung	Gambaran histopatologi hepar mencit Balb/c	Gambaran histopatologi hepar mencit Balb/c dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada lima lapangan pandang.	Rasio

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan

Bahan-bahan untuk percobaan ini :

- 1) Mencit Balb/c
- 2) Ekstrak buah kersen (*Muntingia calabura L.*)
- 3) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan :
 - a) Larutan buffer formalin 10%
 - b) Parafin
 - c) Albumin
 - d) Hematoksin Eosin (HE)
 - e) Asam asetat
 - f) Larutan xylol
 - g) Alkohol bertingkat 30 %, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%
 - h) Aquadest
- 4) Makan dan minuman mencit Balb/c
- 5) Hati Ayam

4.7.2 Alat

Alat untuk memberikan perlakuan

- 1) Kandang mencit Balb/c
- 2) Sonde lambung
- 3) Alat untuk mengambil organ (*minor set*)

- 4) Alat untuk membuat preparat histologi (mikrotom, oven, cetakan paraffin)
- 5) Alat untuk melihat preparat histologi hepar (*deck glass, object glass*, mikroskop cahaya)
- 6) Alat untuk mengambil darah mencit : gunting, tabung dengan EDTA
- 7) Alat pengukur kadar asam urat
- 8) Neraca O Hauss
- 9) Botol-botol

4.7.3 Jenis Data

Data yang diambil adalah data primer yaitu dari pembacaan histopatologi hepar dari kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kadar asam urat *pre test* dengan *post test*.

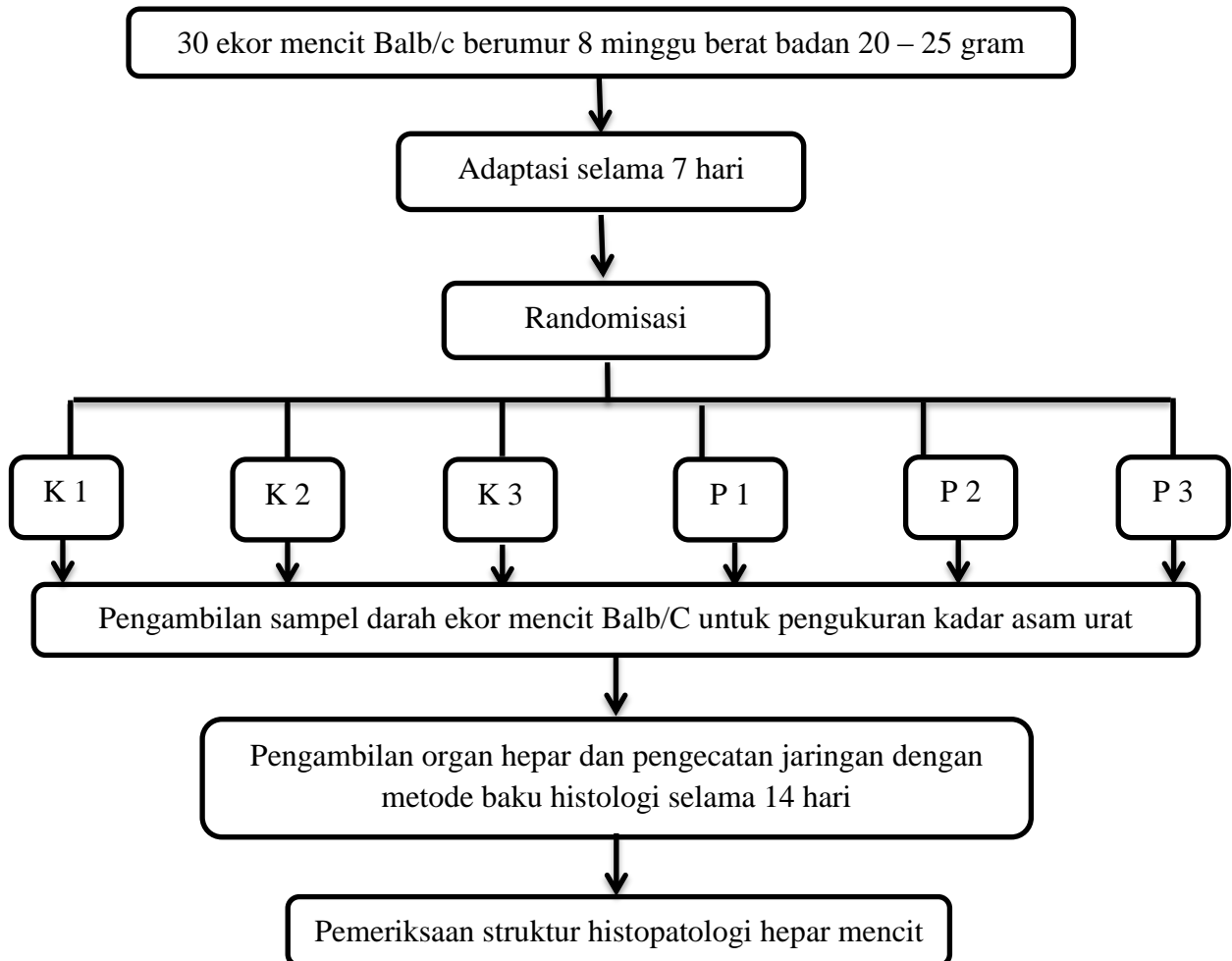
4.7.4 Cara Kerja

1. Dilakukan pengelompokkan secara randomisasi, 30 ekor mencit Balb/c dibagi dalam 6 kelompok.
2. Kelompok kontrol pertama yang diberi pakan standar selama sebulan. Kelompok kontrol kedua diberi pakan standart 7 hari dan diet tinggi purin (hati ayam 100gram untuk 5 ekor) selama 14 hari dan diperiksa kadar asam urat *pre test*, kemudian diberi pakan standar selama 10 hari dan diperiksa kadar asam urat *post test*. Kelompok kontrol ketiga yang diberi pakan standar selama 7 hari dan diperiksa kadar asam urat *pre test*, kemudian disonde ekstrak buah kersen dengan dosis 28 mg/20grBB/hari

(*Muntingia calabura L.*) selama 21 hari dan diperiksa kadar asam urat *post test*.

3. Kelompok perlakuan pertama, kedua, ketiga diberi pakan standar 7 hari dan diet tinggi purin (hati ayam 100 gram untuk 5 ekor) selama 7 hari kemudian diukur kadar asam urat *pre test* pada hari ke 21.
4. Pada hari ke-15, kelompok perlakuan pertama disonde ekstrak buah kersen dengan dosis 14 mg/20grBB/hari, kelompok perlakuan kedua diberi ekstrak buah kersen dengan dosis 28 mg/20grBB/hari, dan kelompok perlakuan ketiga disonde ekstrak buah kersen dengan dosis 56 mg/20grBB/hari selama 14 hari. Kemudian diukur kadar asam urat *post test nya*.
5. Semua kelompok hewan coba dilakukan diterminasi. Kemudian dilakukan pembedahan, pembuatan dan pemeriksaan preparat histopatologi hepar. Organ hepar dari mencit Balb/c diproses secara mikroteknik dan dilakukan pengecatan dengan HE.
6. Masing-masing preparat dibaca pada lima lapangan pandang dilihat pada lima area yaitu keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan perbesaran 100x dan 400x serta dianalisis menggunakan mikroskop cahaya untuk dinilai index histopatologinya.

4.8 Alur Penelitian



Keterangan :

K 1 : mencit Balb/c dengan pakan standar selama 28 hari

K 2 : mencit Balb/c + diet tinggi purin selama 14 hari dan pakan standar selama 10 hari

K 3 : mencit Balb/c + pakan standar + ekstrak buah kersen dosis 28 mg/20grBB/hari selama 21 hari

P 1 : mencit Balb/c + diet tinggi purin selama 7 hari + ekstrak buah kersen dengan dosis 14 mg/20grBB/hari selama 14 hari

P 2 : mencit Balb/c + diet tinggi purin selama 7 hari + ekstrak buah kersen dengan dosis 28 mg/20grBB/hari selama 14 hari

P 3 : mencit Balb/c + diet tinggi purin selama 7 hari + ekstrak buah kersen dengan dosis 56 mg/20grBB/hari selama 14 hari

4.9 Analisis Data

Jumlah sel hepar yang berdegenerasi yang didapatkan, dilakukan uji parametrik menggunakan *One Way ANOVA*. Dilakukan uji normalitas distribusi menggunakan *Saphiro-Wilk*, kemudian dilakukan uji *Homogeneity of Variances* untuk mengetahui homogenitas data. Setelah uji ANOVA bermakna dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan pada masing-masing kelompok. Analisis data dilakukan menggunakan *SPSS for windows v.21*.

Data yang didapatkan diolah. Sebelum penelitian dimulai peneliti (Pengamat A) melakukan perhitungan sel hepar yang berdegenerasi bersama dengan Pengamat B sebagai acuan dalam penelitian. Hasil perhitungan pengamat A dan pengamat B kemudian dilakukan uji reliabilitas dengan menggunakan metode *Intraclass Correlation Coefficient* dan apabila didapatkan hasil $> 0,80$ dapat dikatakan pengamat A setara dengan pengamat B.

Pada kadar asam urat *pre Test* dan *post test* dilakukan uji parametrik menggunakan *Repeated ANOVA*. Dilakukan uji normalitas distribusi menggunakan *Saphiro-Wilk*. Dari uji tersebut didapatkan distribusi data tidak normal maka dilakukan uji *Friedman*. Dari uji *Friedman* didapatkan nilai yang bermakna, maka dilakukan uji *Mann Whitney* untuk membandingkan kadar asam

urat *Pre Test* dan *Post Test* antar kelompok mencit. Hasil yang didapat terdapat perbedaan yang bermakna, maka dilakukan uji *Post Hoc*, yaitu uji *Wilcoxon*.

Jika didapatkan hasil yang berbeda bermakna, maka ada perbedaan yang besar gambaran histopatologi hepar mencit Balb/c yang hiperurisemia pada pemberian ekstrak buah kersen (*Muntingia calabura L.*) dosis bertingkat dan atau terdapat perbedaan antara kadar asam urat *Pre Test* dengan *Post Test*. Jika didapatkan hasil yang berbeda tidak bermakna, maka terdapat perbedaan tidak terlalu besar pada gambaran histopatologi hepar mencit Balb/c yang hiperurisemia pada pemberian ekstrak buah kersen (*Muntingia calabura L.*) dosis bertingkat dan atau tidak terdapat perbedaan antara kadar asam urat *Pre Test* dengan *Post Test*.

4.10 Etika Penelitian

Ethical Clearence telah dimintakan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro sebelum penelitian dilakukan. Mencit Balb/c dipelihara di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Hewan diberi makan dan minum ad libitum. Untuk perlakuan, mencit Balb/c diberi diet tinggi purin selama 7 hari. Perlakuan dosis bertingkat ekstrak buah kersen (*Muntingia calabura L.*) dicampur aquadest. Hewan diterminasi dengan cara dekapitasi. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian ditanggung oleh peneliti.

4.11 Jadwal Penelitian

