

BAB III

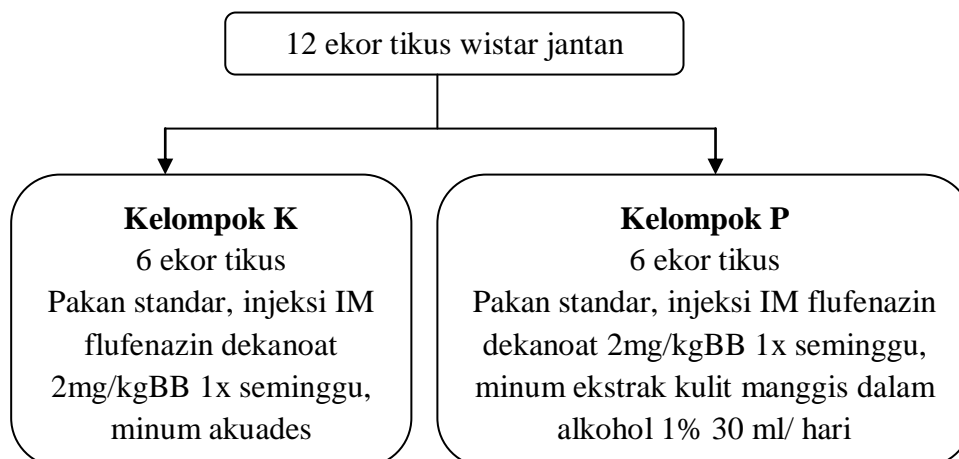
METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup keilmuan penelitian ini adalah Ilmu Patologi Anatomi, Ilmu Jiwa, dan Ilmu Farmakologi.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian *true* eksperimental dengan desain penelitian *Post Test Only Control Group Design* dimana sampel dibagi menjadi 2 kelompok, yang terdiri dari 1 kelompok kontrol dan 1 kelompok perlakuan (K,P). K merupakan kelompok kontrol yang diberi makan minum standar dan diinjeksi flufenazin dekanooat intramuskular. P merupakan kelompok perlakuan yang diinjeksi flufenazin dekanooat intramuskular dan diberi ekstrak kulit manggis serta pakan standar



Gambar 11 Rancangan Penelitian

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi FK UNDIP. Sedangkan, pembuatan spesimen dan pemeriksaan histologi hepar dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UNDIP. Penelitian direncanakan selama dua setengah bulan (75 hari), dengan pemberian perlakuan obat 1x seminggu dan perlakuan mastin 1x tiap hari selama 50 hari. Penelitian dilakukan mulai bulan Februari sampai April 2016.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah tikus wistar jantan.

3.4.2 Sampel

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

3.4.2.1 Kriteria inklusi

- Tikus wistar jantan
- Usia 3 bulan
- Berat badan 180-250 gram

3.4.2.2 Kriteria eksklusi

- Tikus yang sakit atau tampak tidak sehat
- Terdapat kelainan anatomis

3.4.2.3 Kriteria *Drop out*

Tikus mati di tengah–tengah penelitian.

3.4.4 Cara Sampling

Sampel dipilih dari populasi menggunakan teknik *simple random sampling* (acak sederhana) dengan cara pengundian.

3.4.5 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan ketentuan *World Health Organization* (WHO), yaitu minimal 5 ekor untuk setiap kelompok. Penelitian ini juga menganut prinsip 3R, yaitu *reduction, replacement, and refinement*, supaya lebih etis dalam percobaan menggunakan hewan sebagai sampel.⁴⁵ Untuk menjaga agar tingkat representatifnya tinggi apabila terjadi *drop out*, maka jumlah sampel diperbanyak menjadi 6 ekor tiap kelompok. Karena ada 2 kelompok tikus, maka jumlah total sampel adalah $6 \times 2 = 12$ ekor tikus.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) dan injeksi obat flufenazin dekanat.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran mikroskopis hepar tikus.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2 Definisi Operasional

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
Bebas	Ekstrak kulit manggis	Kulit manggis yang dimaserasi lalu diekstrak dengan etanol, hasilnya dikemas dalam produk komersial yang merupakan obat herbal terstandar dengan merek mastin. Bubuk mastin diberikan dengan dosis 120 miligram, dilarutkan dalam alkohol 1% 30ml. ¹⁹ Mastin dilarutkan dalam alkohol 1% karena mastin mempunyai polaritas tinggi sehingga tidak larut dalam air, dan diberikan dengan kadar 1% agar tidak toksik bagi hepar tikus. ²⁴ Mastin diberikan per oral tiap hari dengan dicampurkan dalam air minum tikus dengan volume 30ml karena kebutuhan konsumsi air tikus wistar dewasa dengan berat 200-350gram adalah 25-40ml per hari. ¹⁹	Nominal
Bebas	Flufenazin dekanoot	obat antipsikotik golongan fenotiazin dengan nama dagang Fludekat ini diberikan secara injeksi intramuskular pada otot gluteus tikus 1x tiap minggu dengan dosis 2mg/kgBB. ⁴⁶ Dosis diperoleh dari konversi dosis fludekat yang dapat menyebabkan kerusakan hepar. Fludekat 1 ampul 25mg/ml diencerkan 10x dengan dilarutkan dalam sesame oil ⁴⁴ sehingga konsentrasinya menjadi 2,5mg/ml lalu disterilkan. Bila berat badan tikus 200g, maka dosis obatnya adalah 0,16ml.	Nominal

Terikat	Gambaran mikroskopis hepar tikus	Gambaran mikroskopis hepar tikus yang telah didekapitasi lalu dicat dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE). Pemeriksaan preparatnya menggunakan mikroskop cahaya. Perubahan histopatologi diamati di daerah sekitar vena sentralis dengan perbesaran 400x pada 4 lapang pandang masing-masing 25 sel. Gambaran mikroskopis hepar tikus wistar dinilai dengan menghitung tingkat kerusakan hepatosit berdasarkan perubahan struktur histologi sel hepar menurut Manja Roenigk sebagai berikut :	Ordinal
		<p>1) Skor 1 (Normal)</p> <p>Tampak sel bentuk poligonal, sitoplasma berwarna merah homogen, dinding sel berbatas tegas.</p> <p>2) Skor 2 (Degenerasi parenkimatosa)</p> <p>Pembengkakan sel disertai sitoplasma keruh bergranula</p> <p>3) Skor 3 (Degenerasi hidropik)</p> <p>Tampak sel sembab, akumulasi cairan dan terdapat banyak vakuola.</p> <p>4) Skor 4 (Nekrosis)</p> <p>Kerusakan sel permanen atau kematian sel, terdapat 3 bentuk yaitu:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Piknotik : tampak inti sel kecil warna gelap (basofilik) dan sitoplasma sel kemerahan. ▪ Karioreksis : sel mengecil, kontur sel ireguler, fragmentasi inti sel menjadi beberapa bagian kecil ▪ Kariolisis : inti sel hilang 	

Skoring derajat histopatologis hepar yang digunakan berdasarkan uji skoring penelitian Histopathology Liver Induced-Drugs Manja Roenigk. Uji ini dilakukan dengan membuat skor pada setiap kerusakan hepatosit.⁴⁷

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mastin (ekstrak kulit manggis) yang diberikan dalam dosis 130mg/tikus yang dilarutkan dalam 30ml alkohol 1%, mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Joni Kusnadi, dan flufenazin dekanolat yang dilarutkan dalam sesame oil dengan dosis 2mg/kgBB mengacu penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Shukla M.D. Reagen untuk membuat spesimen hepar yaitu formalin 10%, larutan ether alkohol, larutan xylene, albumin, parafin, cat HE.

3.7.2 Alat Penelitian

Alat penelitian yang dipergunakan :

- a. Timbangan untuk menimbang tikus
- b. Timbangan untuk menimbang mastin
- c. Lemari untuk menyimpan mastin dan obat
- d. Spuit 1ml untuk injeksi intramuskular tikus
- e. Instrumen untuk membuat spesimen hepar tikus
- f. Mikroskop untuk mengamati histopatologi hepar tikus
- g. Pena dan buku catatan untuk mencatat hasil pengamatan dan penelitian

3.7.3 Jenis Data

Jenis data yang diperoleh adalah data primer karena data didapatkan dari eksperimen yang dilakukan sendiri oleh peneliti.

3.7.4 Cara Kerja

1. Sampel penelitian sebanyak 12 ekor tikus jantan galur wistar diadaptasi dan diberi pakan standar selama 7 hari di laboratorium
2. Sampel (12 ekor tikus wistar) dikelompokkan dengan teknik randomisasi acak sederhana menjadi 2 kelompok (masing-masing kelompok berjumlah 6 ekor tikus) yaitu kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan 1 (P). Kelompok P ditempatkan dalam kandang masing-masing tiap tikus, sedangkan kelompok K ditempatkan dalam kandang bersama. Tiap kandang kelompok P diberi cermin pengilon supaya tikus tidak stres karena merasa ada temannya.
3. Perlakuan diberikan pada masing-masing kelompok sebagai berikut :

Kelompok K : tikus diberi pakan standar setiap hari, diinjeksi fludekat

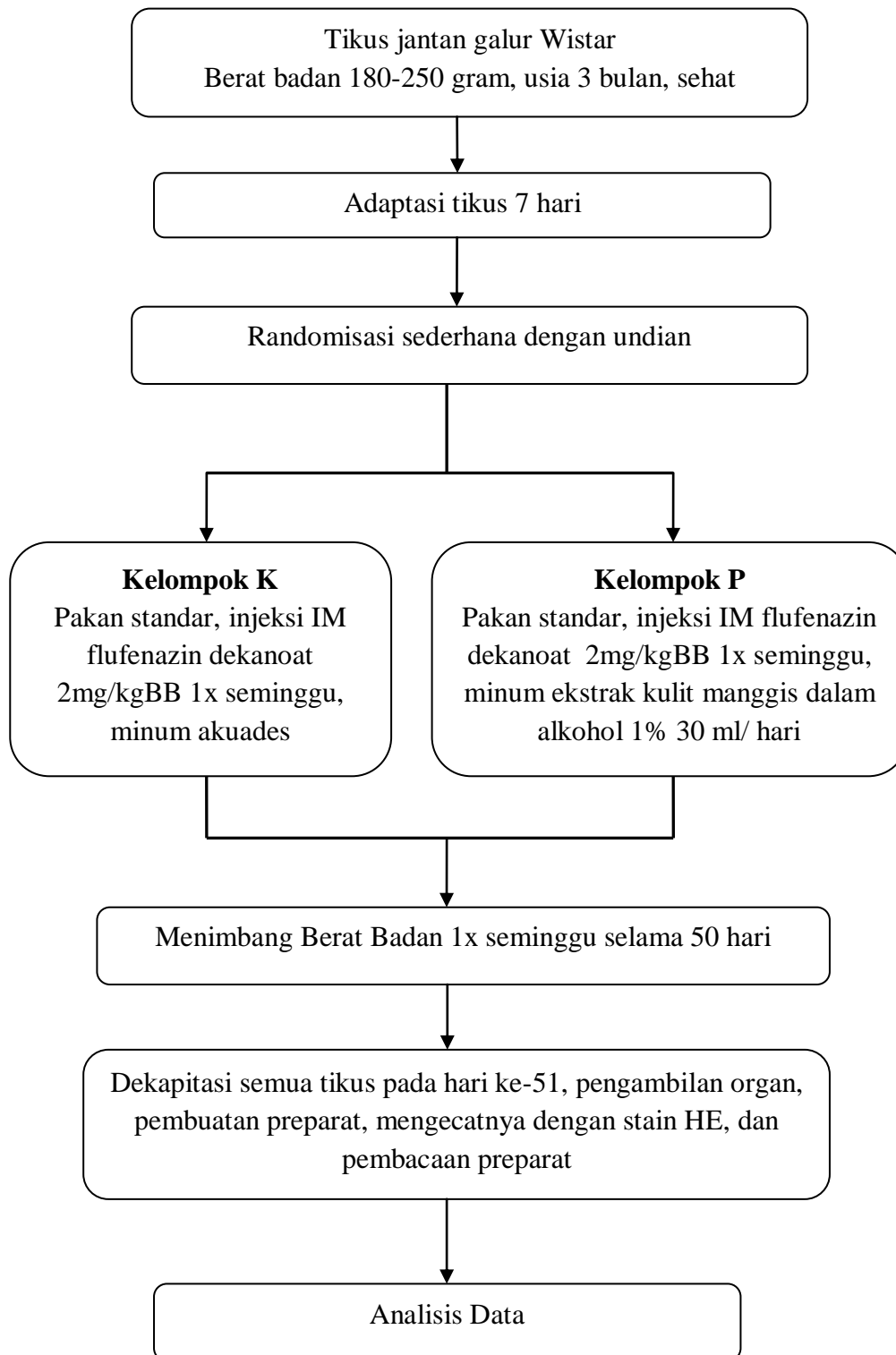
IM pada otot gluteus dosis 2mg/kgBB yang dilarutkan dalam sesame oil 1x1 minggu, dan minum akuades 250ml (1 botol untuk bersama).

Kelompok P : tikus diberi pakan standar, diinjeksi fludekat IM pada otot

gluteus dosis 2mg/kgBB yang dilarutkan dalam sesame oil 1x1 minggu, dan diberi mastin yang dilarutkan dalam alkohol 1% 30 ml sebagai air minumnya 1x1 hari.

4. Menimbang berat badan tikus seminggu sekali untuk menghitung dosis obat yang diberikan setiap minggunya dan memantau perkembangan tikus. Perlakuan dilakukan selama 50 hari.
5. Pada hari ke-51 semua tikus didekapitasi secara *lege artis*. Organ hepar segera diambil, dicuci dalam larutan fisiologis (NaCl 0,9%), ditimbang, diiris, dan segera difiksasi di dalam larutan formalin 10% selama 24 jam.
6. Setelah *distreaming*, organ dimasukkan dalam *tissue cassette* yang dimasukkan dalam *tissue processor* untuk tahap dehidrasi, *clearing*, *embedding*. Tahap bloking dilakukan dengan parafin blok, lalu proses *cutting* menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5-6 μ . Selanjutnya preparat diwarnai dengan pewarnaan HE.
7. Preparat dikeringkan dan ditutup dengan cover glas, sehingga siap diperiksa di bawah mikroskop. Untuk menghilangkan subyektifitas, pembacaan hasil preparat dilakukan oleh lebih dari 1 pemeriksa lalu dilakukan penghitungan kesesuaian antara pemeriksa.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 12 Alur Penelitian

3.9 Manajemen Data dan Analisis Data

3.9.1 Manajemen Data

Data yang sudah terkumpul akan dianalisis oleh program komputer, tetapi pertama data harus diolah terlebih dahulu melalui beberapa tahap yaitu *editing*, *coding*, *entry*, dan *cleaning*.

3.9.2 Analisis Data

Analisis data dimulai dengan statistik deskriptif atau analisis univariat. Karena variabel penelitian adalah variabel kategorik, yaitu nominal dan ordinal, maka penyajian data dalam bentuk tabel atau grafik yang berisi frekuensi dan persentase data. Selanjutnya dilakukan uji *weighted* Kappa sebagai uji kesesuaian pada variabel gambaran mikroskopis hepar. Uji hipotesis yang dipakai adalah statistik non parametrik, yaitu uji *Chi-Square* yang merupakan uji komparatif kategorik. Jika tidak memenuhi syarat uji *Chi-Square* maka dilakukan uji Kolmogorov-Smirnov yang merupakan alternatif uji *Chi-Square*. Bila nilai $p < 0,05$, maka dianggap ada hubungan yang bermakna antara dua variabel tersebut (hipotesis nol ditolak, hipotesis alternatif diterima). Pengolahan data dilakukan dengan program komputer SPSS versi 21.0 for *windows*.⁴⁸

3.10 Etika Penelitian

Sebelum melakukan penelitian, peneliti meminta ijin *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran Undip - Rumah Sakit Dokter Kariadi (RSDK). Tikus wistar diperoleh dari Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri

Semarang dan dipelihara di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Selama penelitian, tikus diperlakukan dengan baik yaitu tidak disakiti, kandangnya dibersihkan setiap hari, diberi pakan standar dan minum akuades secukupnya. Pemberian injeksi IM dilakukan secara *lege artis*. Saat dekapitasi juga dilakukan dengan cepat agar rasa sakitnya minimal, yaitu dengan dislokasi leher. Setelah dibedah dan diambil organnya, tikus tidak langsung dibuang, tetapi dikuburkan dengan baik.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 3 Jadwal Penelitian

No	Hal yang Dilakukan	Bulan ke-		
		1	2	3
1	Pencarian tikus dan mengajukan <i>ethical clearance</i>	√		
2	Persiapan alat, bahan, dan lokasi penelitian	√		
3	Penyesuaian tikus dengan lingkungan baru dan pengukuran berat badannya	√		
4	Eksperimen		√	√
5	Terminasi dan pembuatan preparat			√
6	Pembacaan preparat dan analisis hasil			√
7	Penyusunan laporan akhir			√