

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang Lingkup Penelitian**

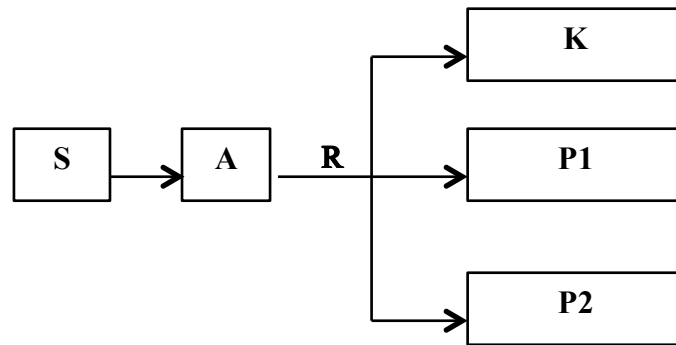
Pada penelitian ini ruang lingkup keilmuan yang digunakan adalah Ilmu Anatomi, Patologi Anatomi, dan Farmakologi.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

- 1) Tempat pemeliharaan dan intervensi terhadap hewan coba dilakukan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- 2) Pembuatan preparat hewan coba dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi Semarang.
- 3) Penelitian dan Pengumpulan data berlangsung dari bulan Februari s/d April 2016

#### **3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental* dengan *Post Test Only Control Group Design*, yang menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian. Perlakuan berupa pemberian dosis tunggal UDCA serta pemberian kombinasi UDCA dan glutathione pada tikus wistar yang telah dilakukan ligasi duktus koledokus dengan parameter pengukuran variabel yaitu derajat fibrosis hepar. Penelitian tidak diawali dengan pra tes karena pada penelitian ini pengambilan organ untuk pemeriksaan hanya bisa dilakukan satu kali, sehingga tidak mungkin dilakukan keduanya.



**Gambar 7 Rancangan Penelitian**

- S : Sampel
- A : Aklimatisasi
- R : Randomisasi
- K : Kontrol. Tikus wistar yang dilakukan ligasi duktus koledokus, diberi pakan standar selama 21 hari berturut-turut.
- P1 : Perlakuan 1. Tikus wistar yang dilakukan ligasi duktus koledokus, diberi pakan standar dan UDCA dengan dosis 20 mg diberikan secara per oral satu kali sehari selama 21 hari berturut-turut. Selanjutnya, dilakukan laparotomi dan pengambilan organ hepar untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi pada hari ke-22.
- P2 : Perlakuan 2. Tikus wistar yang dilakukan ligasi duktus koledokus, diberi pakan standar serta kombinasi UDCA 20 mg satu kali sehari dengan bantuan sonde dan glutathione dengan dosis 15 mg diberikan secara intramuskular satu kali sehari selama 21 hari berturut-turut. Selanjutnya, dilakukan laparotomi dan pengambilan

organ hepar untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi pada hari ke-22.

### **3.4 Populasi dan Sampel Penelitian**

#### **3.4.1 Populasi Penelitian**

Populasi pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan

#### **3.4.2 Sampel Penelitian**

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

##### **3.1.1.1 Kriteria Inklusi**

- 1) Tikus jantan wistar
- 2) Usia 2-3 bulan
- 3) Berat Badan 200-250 g
- 4) Sehat dan aktif

##### **3.1.1.2 Kriteria Eksklusi**

- 1) Terdapat kecacatan anatomis

##### **3.1.1.3 Kriteria Dropout**

- 1) Mati selama penelitian
- 2) Selama perlakuan mengalami infeksi setelah operasi

#### **3.4.3 Cara Sampling**

Sampling pada penelitian ini dilakukan secara randomisasi atau acak.

### 3.4.4 Besar Sampel

Penelitian besar sampel minimal yang digunakan menurut *Institutional Animal Care and Use Comitee Guidebook* dan *World Health Organization* (WHO) adalah 5 ekor tiap kelompok dengan menganut prinsip 3R (*Replacement, Reduction and Refinement*).<sup>58</sup> Berdasar hal tersebut, jumlah sampel yang digunakan sebanyak 15 ekor tikus wistar jantan, dengan 5 ekor tikus tiap kelompok perlakuan. Sedangkan untuk mengantisipasi dikeluarkannya tikus akibat adanya kriteria dropout, maka pada tiap kelompok perlakuan akan ditambah satu ekor tikus hingga jumlah sampel sejumlah 18 ekor.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

UDCA

Glutathione

#### 3.5.2 Variabel Terikat

Gambaran fibrosis hepar pada tikus wistar jantan.

### 3.6 Definisi Operasional

**Tabel 3 Definisi Operasional**

Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
UDCA	Asam empedu hidrofilik yang digunakan dalam terapi penyakit kolestasis dengan dosis pada manusia 13-15 mg/kgBB,	mg	Nominal

---

	sedangkan pada tikus wistar dosis 20 mg tiap tikus, diberikan per oral satu kali sehari selama 21 hari berturut-turut.		
Glutathione	Antioksidan yang dapat berfungsi dalam mencegah proses stress oksidatif. Glutathione yang digunakan adalah Tationil <sup>®</sup> diberikan dengan dosis 600 mg intramuskular pada manusia, sedangkan dosis pada tikus 15 mg secara intramuskular. Diberikan satu kali sehari selama 21 hari berturut-turut.	mg	Nominal
Derajat fibrosis hepar	Menilai derajat fibrosis pada gambaran hepar tikus yang telah diberi perlakuan selama 21 hari berturut-turut. Sel diamati pada 5 lapangan pandang menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x kemudian ditentukan derajat fibrosisnya berdasar sistem penentuan derajat Laennec.		Ordinal

---

---

Grade 0 : Tidak ada  
fibrosis  
Grade 1: Fibrosis minimal  
Grade 2: Fibrosis ringan  
Grade 3: Fibrosis sedang  
Grade 4A: Sirosis, *mild  
definite or probable*  
Grade 4B: Sirosis sedang  
Grade 4C: Sirosis berat

---

### **3.7 Cara Pengumpulan Data**

#### **3.7.1 Bahan**

- 1) Hepar tikus wistar yang telah diberi perlakuan
- 2) UDCA
- 3) Glutathione
- 4) Makanan tikus
- 5) Larutan Buffer Formaldehyde 10%
- 6) Ethanol 70%
- 7) Blok parafin
- 8) Aquadest
- 9) Ketamin
- 10) Minyak emersi
- 11) Ibuprofen
- 12) Sefotaksim
- 13) Benang silk 4,0

### 3.7.2 Alat

- 1) Kandang tikus yang didesain khusus
- 2) Pinset
- 3) Scalpel
- 4) Jarum
- 5) Sonde
- 6) Alat tulis
- 7) Wadah berukuran sedang
- 8) *Beaker glass*
- 9) Autoclave
- 10) Mikrotom
- 11) Object glass
- 12) Mikroskop Olympus CX.21

### 3.7.3 Jenis Data

Penelitian ini menggunakan jenis data primer yang diperoleh dari gambaran mikroskopis derajat fibrosis hepar tikus.

### 3.7.4 Cara Kerja

#### 3.7.4.1 Perlakuan

Penelitian ini menggunakan preparat parafin blok hepar tikus galur wistar. Penelitian dilakukan selama 21 hari

- 1) Sampel (18 ekor tikus wistar jantan) diadaptasi dan diberi pakan dan minum standar secara *ad libitum* selama 2 hari di laboratorium.

- 2) Sampel (18 ekor tikus wistar jantan) dikelompokkan dengan teknik randomisasi acak sederhana menjadi 3 kelompok (masing-masing kelompok berjumlah 6 ekor tikus), yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1, dan kelompok perlakuan 2.
- 3) Seluruh tikus pada tiap kelompok dilakukan operasi pengikatan atau ligasi pada duktus koledokus. Sebelum dilakukan operasi tikus diberi antibiotik sefotaksim dengan dosis 18 mg intravena kemudian tikus diberi anestesi ketamin hidroklorida dengan dosis 0.5 cc intramuskular. Selanjutnya dilakukan laparotomi, dalam kondisi aseptik dilakukan pengikatan pada duktus koledokus tikus. Ikatan dilakukan dengan benang silk 4,0. Selain itu diberikan analgesia pasca operasi Ibuprofen 7 mg per oral selama 3 hari berturut-turut untuk meringankan nyeri.
- 4) Persiapan UDCA dengan dosis 20 mg dengan pemberian per oral.
- 5) Persiapan glutathione dengan dosis 15 mg diberikan secara intramuskular.
- 6) Kelompok kontrol, tikus wistar jantan yang telah dilakukan ligasi duktus koledokus diberi pakan dan minum standar ad libitum selama 21 hari berturut-turut.
- 7) Kelompok perlakuan 1, tikus wistar jantan yang telah dilakukan ligasi duktus koledokus diberi UDCA dengan dosis 20 mg diberikan secara per oral dengan bantuan sonde selama 21 hari berturut-turut.



- 8) Kelompok perlakuan 2, tikus wistar jantan yang telah dilakukan ligasi duktus koledokus diberi UDCA dengan dosis 20 mg diberikan secara per oral dengan bantuan sonde serta diberi glutathione dengan dosis 15 mg diberikan secara intramuskular selama 21 hari berturut-turut.

Pada hari ke 22 setelah selesai pemberian perlakuan, semua hewan percobaan diterminasi dengan cara anestesi overdosis. Organ hepar diambil dan direndam dalam formalin 10%. Hepar dikirim ke bagian Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi Undip untuk dilakukan proses blok parafin. Blok parafin dipotong dan dilakukan pengecatan menggunakan pengecatan *Masson's trichrome* (MT). Pengecatan MT umum digunakan untuk pemeriksaan derajat fibrosis hepar sebab pengecatan MT memberikan gambaran fibrosis stadium awal ataupun stadium akhir dengan baik sedangkan pengecatan *Hematoxylin-Eosin* (HE) tidak dapat memberikan gambaran fibrosis stadium awal dengan baik. Pengecatan MT juga dapat membedakan gambaran fibrosis dan nekrosis, dengan gambaran nekrosis tampak lebih pucat dibandingkan gambaran septa fibrosa yang tampak lebih padat.<sup>59</sup>

#### **3.7.4.2 Prosedur pembuatan preparat histopatologi**

##### **1) Fiksasi**

Usaha untuk mempertahankan elemen-elemen sel atau jaringan agar tetap pada tempatnya dan tidak mengalami perubahan apapun menggunakan larutan formalin (BNF) 10% selama 3 jam. Jaringan dipotong dengan ketebalan 2-3 mm kemudian dimasukkan ke dalam kaset.

## 2) Dehidrasi

Dehidrasi adalah proses penarikan molekul air dari dalam jaringan. Tujuan dari dehidrasi adalah agar seluruh ruang-ruang antar sel dalam jaringan dapat diisi dengan parafin. Dehidrasi dilakukan dengan menggunakan alkohol 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 96% selama 2 x 1 jam, dan alkohol 100% selama 2 x 1 jam.

## 3) Clearing

Clearing merupakan proses untuk menjernihkan jaringan. Proses clearing berfungsi untuk menarik alkohol atau dehidran yang lain dari dalam jaringan agar dapat digantikan dengan parafin. Proses yang dilakukan adalah dengan memasukkan jaringan ke dalam larutan xylol selama 3 x 1 jam.

## 4) Impregnasi

Jaringan dimasukkan ke dalam parafin cair 2 x 2 jam.

## 5) Embedding

Kaset dibuka, masukkan jaringan kedalam "base mould" sesuai kaidah, isi "base mould" dengan parafin cair (Histoplast) suhu 60°C, tutup dengan kaset dan dibekukan. Pembuatan blok parafin satu kaset 1 menit, menggunakan alat histostar

## 6) Pemotongan microtome

Pemotongan blok parafin dengan ketebalan 2 - 5  $\mu\text{m}$ . Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam incubator 56-58°C sampai parafin mencair.

### 3.7.4.3 Pengecatan *Masson trichrome*

1) Dilakukan proses deparafinisasi. Secara berurutan kaca obyek dimasukkan ke dalam:

- i) Xylol : 10 menit
- ii) Xylol : 10 menit
- iii) Xylol : 10 menit
- iv) Ethanol : 1 menit
- v) Alkohol 96% : 1 menit
- vi) Alkohol 80% : 1 menit
- vii) Alkohol 70% : 1 menit
- viii) Alkohol 50% : 1 menit
- ix) Aquadest : 10 menit

2) *Bouin's fluid* dalam oven dengan suhu 56°C selama 1 jam atau *microwave* selama 30 detik, kemudian diamkan pada suhu ruang selama 5 menit.

3) Cuci dengan air mengalir selama 3-5 menit.

4) *Weigert's Iron Hematoxylin* ( A+B ) perbandingan 1:1 selama 10 menit.

5) Cuci air mengalir selama 5-10 menit.

6) *Biebrich Scarlet-Acid fuchsin solution* selama 5-10 menit

7) Cuci air mengalir 30 detik.

8) Tetesi dengan *Phospho-tungstic acid solution* selama 5 menit.

9) Tetesi dengan *Aniline Blue solution* selama 5-10 menit.

10) Tetesi 1% *Acetic acid* selama 1 menit.

11) Cuci air mengalir selama 30 detik

12) Keringkan.

13) Mounting

Proses penutupan objek glass dengan deck glass menggunakan EZ MOUNT.

14) Pelabelan

Penulisan label sesuai nomor

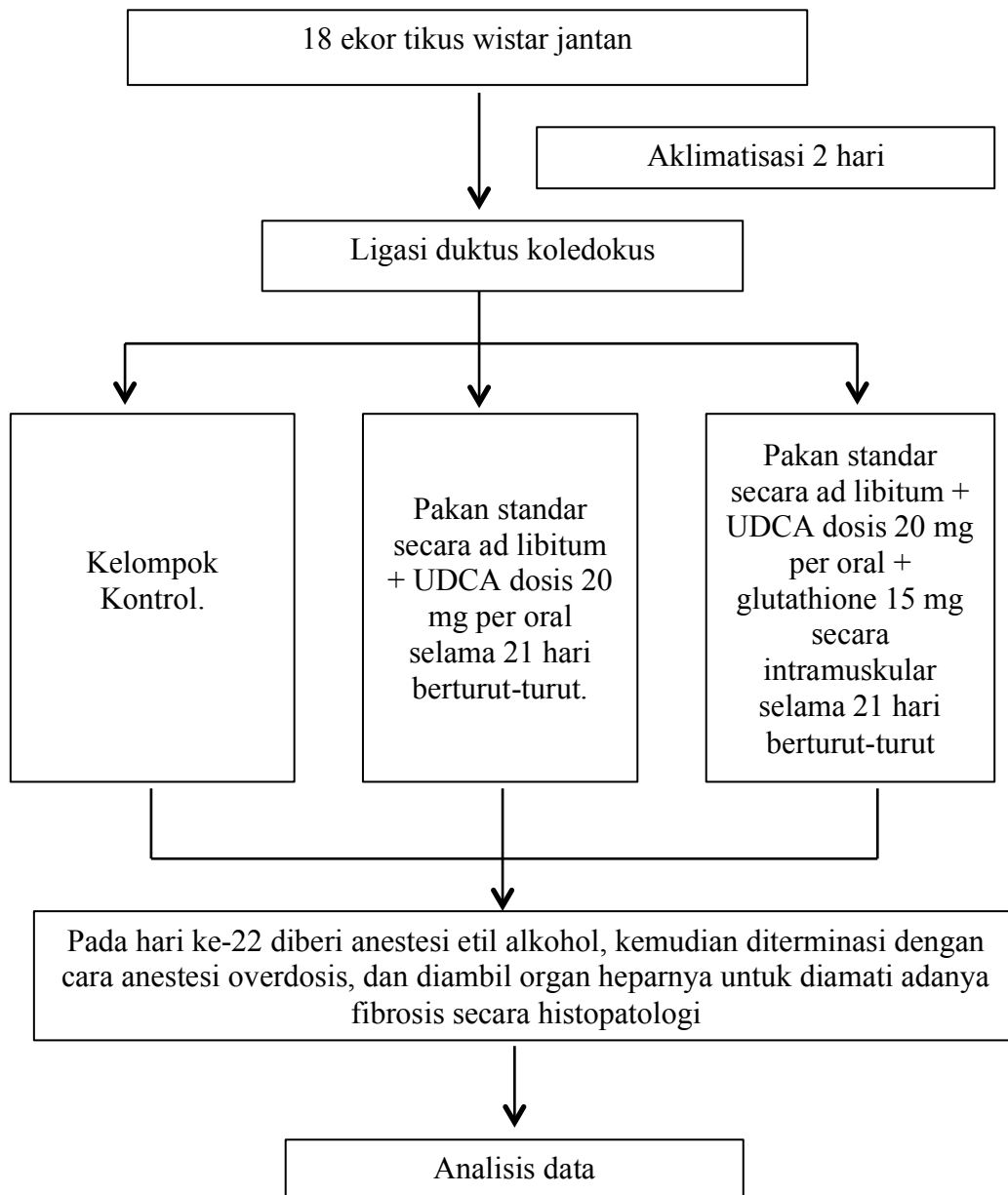
### **3.7.5 Pemeriksaan Gambaran Histologi Derajat Fibrosis Hepar**

Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop CX21 dengan perbesaran 100x. Derajat fibrosis dinilai menggunakan sistem penentuan derajat semi kuantitatif Laennec. Gambaran fibrosis diamati pada 5 lapangan pandang dengan perbesaran 100x oleh dr. Ika Pawitra Miranti, M.Kes, Sp.PA sebagai ahli Patologi Anatomi.

**Tabel 4 Laennec's Scoring System**

Grade	Nama	Septa (Ketebalan & jumlah)	Kriteria	Skor
0	Tidak ada fibrosis			0
1	Fibrosis minimal	+/-	Tidak ada septa atau sedikit septa tipis; mungkin didapatkan ekspansi portal atau fibrosis sinusoidal ringan	1
2	Fibrosis ringan	+	Beberapa septa tipis; mungkin didapatkan ekspansi portal atau fibrosis sinusoidal ringan	2
3	Fibrosis sedang	++	Septa tipis moderat; hingga sirosis inkomplit.	3
4A	Sirosis, <i>mild definite or probable</i>	+++	Septa tampak jelas dengan kontur melingkar atau nodul yang tampak jelas. Sebagian besar septa berukuran tipis. (diperbolehkan adanya satu septa berukuran luas)	4
4B	Sirosis sedang	++++	Setidaknya terdapat dua septa yang luas, tetapi tidak ada septa yang sangat luas dan didapatkan nodul kecil kurang dari separuh panjang biopsi	5
4C	Sirosis berat	+++++	Setidaknya terdapat satu septa yang sangat luas atau didapatkan nodul kecil lebih dari separuh panjang biopsi (sirosis mikronodular)	6

### 3.8 Alur Penelitian



**Gambar 8 Alur penelitian**

### 3.9 Analisis Data

Data yang terkumpul telah diolah terlebih dahulu melalui proses *editing*, *coding*, *entering and cleaning data*, lalu data dianalisis secara statistik dengan

program SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Uji hipotesis yang digunakan adalah uji Kruskal-wallis karena kelompok-kelompok pengukuran dalam penelitian ini berskala kategorikal, tidak berpasangan dan berjumlah lebih dari 2 kelompok. Jika hasil uji Kruskal-wallis bermakna maka akan dilanjutkan uji Mann-whitney. Nilai P dianggap bermakna bila  $p < 0,05$  dengan 95% interval kepercayaan.<sup>60</sup>

### **3.10 Etika Penelitian**

Sebelum dilakukan penelitian, telah dimintakan *Ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP dr. Kariadi, Semarang.