

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

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

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi RS Kariadi Semarang untuk pengandangan, pemberian pakan, perlakuan hewan coba dan pengujian sampel. Penelitian dan pengumpulan data pada penelitian ini akan dilaksanakan dari bulan Februari-April tahun 2016.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental dengan rancangan penelitian *post test only controlled group design*. Perlakuan yang diberikan adalah dengan memberikan fluphenazine decanoate injeksi intramuskular, sedangkan luaran (*outcome*) adalah kadar enzim katalase hepar dan gambaran histopatologi hepar tikus wistar jantan.

3.4 Populasi dan sampel

3.4.1 Populasi target

Dalam penelitian ini adalah seluruh tikus Wistar jantan berumur 3 bulan dengan berat 200 gram.

3.4.2 Populasi terjangkau

Seluruh tikur Wistar jantan berumur 3 bulan dengan berat badan 200 gram yang berada di lokasi penelitian dan memenuhi kriteria inklusi

3.4.3 Sampel

3.4.3.1 Kriteria inklusi

- Tikus wistar Jantan
- Umur 8-12 minggu
- Berat 200 gram

3.4.3.2 Kriteria eksklusi

- Tikus sakit
- Cacat fisik

3.4.4 Cara Sampling

Cara sampling yang digunakan adalah *simple random sampling*. Tikus wistar dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok K, P1, dan P2, dengan masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus wistar jantan.

- a. Kelompok K (kontrol) diberi diet standar dan injeksi sesame oil
- b. Kelompok P1 diberi diet standar dan injeksi fluphenazine dekanoat 1 mg/kgBB/minggu.
- c. Kelompok P2 diberi diet standar dan injeksi fluphenazine dekanoat 2 mg.kgBB/minggu.

3.4.5 Besar sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria World Health Organization (WHO) yang digunakan untuk penelitian dan evaluasi obat tradisional, yaitu tikus jantan minimal 5 ekor untuk masing-masing kelompok dan ditambahkan 1 ekor tikus pada masing-masing kelompok sebagai antisipasi. Penelitian ini membagi sampel menjadi 3 kelompok , sehingga jumlah tikus total 18 ekor.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fluphenazine dekanat injeksi dosis bertingkat

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar katalase hepar dan kerusakan histopatologi hepar tikus wistar.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi operasional	Skala
Fluphenazine decanoate	Obat antipsikotik golongan tipikal long acting. Obat tersebut dilarutkan terlebih dahulu dengan <i>sesame oil</i> yang telah disterilkan lalu diberiakan secara injeksi intramuscular, dimana pada kelompok perlakuan 1 sebesar 1mg/kg BB ; kelompok perlakuan 2 sebesar 2 mg/kg BB	Rasio
Kadar enzim katalase hepar	Organ hepar tikus wistar di blender dengan ditambahkan NaCl lalu diambil sarinya. Lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi diisikan 100 ul Ditambahkan 100 ul larutan H ₂ O ₂ 10% ke dalam gelas ukur yang telah berisi ekstrak hepar. Dibiarkan selama 5 menit.	Rasio
Gambaran histopatologi hepar	Gambaran histopatologi hepar tikus wistar dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop pembesaran 400X. Pada setiap lapangan pandang diamati 20 sel secara acak. Dinilai skor tiap sel dengan menggunakan model skoring <i>Manja Roenick</i> . Kemudian dihitung rerata bobot skor tingkat kerusakan sel hepar dari lima lapang pandang. Kriteria penilaian sebagai berikut : a. Nilai 1 : Normal b. Nilai 2 : Degenerasi parenkimatososa c. Nilai 3 : Degenerasi hidropik d. Nilai 4 : Nekrosis	Ordinal

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

- Fluphenazine decanoate 1 mg/kg BB dan 2 mg/kg BB (Hisashi Kuribara, 1978)
- H₂O₂ 10%
- Ether
- Kapas
- NaCl 0,9%
- Larutan formalin 10%
- Cairan parafin
- Larutan xylol
- HE
- *Phosphate buffer saline (PBS)*
- Sampel hepar tikus wistar

3.7.2 Alat

- Mikropipet
- Gelas ukur
- Mistar
- Stopwatch

- Kaca objek
- Mikroskop binokuler

3.7.3 Jenis data

Data penelitian ini adalah data primer.

3.7.4 Cara kerja

3.7.4.1 Tahap pemeliharaan

Sebelum diberi perlakuan, seluruh sampel diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari dengan pemberian pakan standar. Sampel dibagi menjadi 3 kelompok, masing-masing 6 ekor tikus yaitu kelompok kontrol yang diberi diet standar dengan sesame oil secara injeksi intramuskular, kemudian kelompok perlakuan 1 diberi diet standar dengan fluphenazine decanoate dosis 1 mg/kg BB secara injeksi intramuskular, kelompok perlakuan 2 diberi diet standar dengan fluphenazine decanoate dosis 2 mg/kg BB secara injeksi intramuskular. Injeksi diberikan dengan jarak 7 hari selama 28 hari.¹³ Dosis pemberian didasarkan pada dosis terapi yaitu 0,5-1 mg yang diberikan setiap 2 minggu sekali. Namun, pada penelitian ini diberikan pada dosis terapeutik yaitu 1 mg/kg BB dan dosis toksik 2 mg/kg BB.¹³ Pengenceran obat dilakukan dengan menambahkan minyak wijen steril. Kemudian dosis tersebut dikonversikan terhadap masing-masing berat tikus wistar. Dikarenakan keterbatasan waktu maka untuk mendapatkan efek yang dapat diamati injeksi diberikan setiap 1 minggu sekali.

3.7.4.2 Tahap terminasi

Setelah mengalami perlakuan selama 28 minggu, masing-masing tikus dimasukkan kedalam toples berisi kapas yang sebelumnya diberi ether kemudian ditutup rapat setelah tikus lemas lalu dilakukan dislokasi leher. Hepar di ambil dan dicuci dengan NaCl 0,9%. Hepar ditaruh didalam tempat berisi es lalu ditimbang, kemudian hepar seberat 1 gram di masukkan ke dalam container yang berisi NaCl 20 ml dan diblender.

3.7.4.3 Pembuatan ekstrak organ

Setiap satu gram hepar ditempatkan dalam blender dengan 20 ml larutan fisiologis NaCl 0,9%). Semua bahan diblender sampai homogen. Setelah terbentuk jus hepar ditunggu hingga jus terpisah antara endapan dan ekstraknya. Ekstrak hepar siap digunakan.

3.7.4.4 Pengukuran kadar enzim katalase

Pengukuran enzim katalase dilakukan dengan metode semi kuantitatif. Menyiapkan gelas ukur bersih sebanyak 5 buah. Percobaan dilakukan menjadi tiga sesi yaitu sesi pertama untuk 5 sampel kontrol, kemudian untuk 5 sampel P1, dan terakhir untuk 5 sampel P2. Pada masing-masing tabung reaksi diisikan 100 ul ekstrak hepar. Ditambahkan 100 ul larutan H₂O₂ 10% ke dalam gelas ukur yang telah berisi ekstrak hepar. Penambahan H₂O₂ pada masing-masing sampel harus dilakukan secara

bersamaan. Pada saat tersebut stopwatch juga dinyalakan dan diamati hingga menit ke 5. Setelah 5 menit amati gelembung yang muncul dan ukur menggunakan mistar gelembung yang terbentuk mulai dari perbatasan larutan. Catat hasilnya dan lakukan sebanyak 2 kali untuk masing-masing sampel. Pembacaan pada masing-masing sampel dilakukan oleh dua orang untuk mengurangi subjektifitas.

3.7.4.5 Pembuatan preparat histopatologi hepar

Setelah diterminasi organ hepar diambil dan selanjutnya diletakkan di tabung berisi cairan pengawet buffer formalin 10% dengan 1 bagian hepar dan 9 bagian buffer formalin 10% selama 24 jam. Selanjutnya hepar diblok dengan parafin, dipotong, dan diletakkan pada kaca objek. Blok kemudian dicat dengan HE. Sampel hepar dideparafinasi dan direhidrasi jaringan menggunakan PBS. Sampel dicuci dengan menggunakan aquadest dan dideferensiasi dengan asam asetat 1% selama satu menit, dibuang dan dicuci kembali menggunakan aquadest. Kemudian slide didehidrasi, dibersihkan dan ditutup dengan kaca penutup.

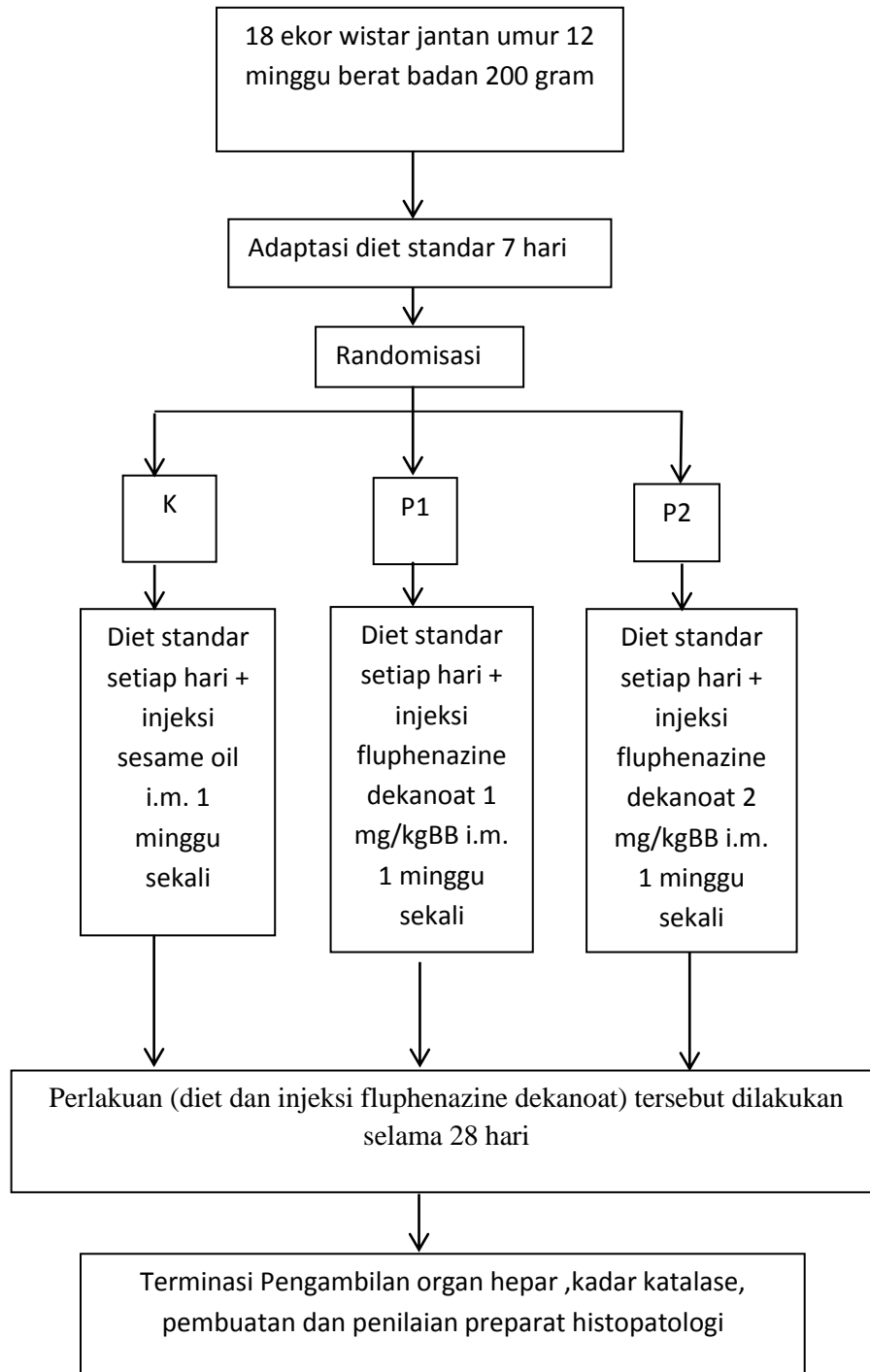
3.7.4.6 Penilaian derajat histologi hepar

Gambaran histopatologi hepar tikus wistar dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop pembesaran 400X. Pembacaan dilakukan oleh spesialis Patologi Anatomi dan peneliti. Pada setiap lapangan pandang diamati 20 sel secara acak. Dinilai skor tiap sel dengan menggunakan model skoring Manja Roenick.

Kemudian dihitung rerata bobot skor tingkat kerusakan sel hepar dari lima lapang pandang. Kriteria penilaian sebagai berikut :³³

- a. Nilai 1 : Normal
Sel berbentuk bulat, mempunyai sitoplasma utuh berwarna ungu, membran sel tidak rusak, dan inti sel bulat di tengah
- b. Nilai 2 : Degenerasi parenkimatosia
Sitoplasma dalam sel hepar membentuk celah-celah kecil
- c. Nilai 3 : Degenerasi hidropik
Sel bengkak dan tampak vakuola-vakuola besar dengan sitoplasma jernih dan tidak ada jejas pada inti
- d. Nilai 4 : Nekrosis
Membran sel rusak dan berbentuk tidak beraturan, sitoplasma kosong dan tidak berwarna, serta inti piknotik, lisis, atau terpecah-pecah.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 5. Bagan alur penelitian

3.9 Analisa Data

Uji statistik dengan menggunakan program software statistic. Data dinilai sebaran distribusinya dengan uji Saphiro Wilk dan didapatkan distribusi data tidak normal sehingga dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu Kruskal Wallis untuk melihat perbedaan pada masing-masing kelompok dan uji Wilcoxon.

3.10 Etika Penelitian

Ijin penelitian atau *ethical clearence* No. 171/EC/FK-RSDK/2016 didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang. Pada penelitian ini digunakan lima belas ekor tikus wistar jantan , umur 8-12 minggu, dengan berat badan sekitar 150-220 gram, diadaptasi di laboratorium secara berkelompok dan diberi pakan standar. Perlakuan diberikan secara injeksi intramuskular. Hewan diterminasi dengan cara dianastesi menggunakan kapas ether, kemudian dikubur oleh tenaga laboratorium Parasitologi RS Kariadi Semarang.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 3. Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan				Bulan				Bulan				Bulan				Bulan							
	11				12				1				2				3				4			
	1	2	3	4	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 & bahan					■				■															
Penelitian					■				■				■											
Analisis data & evaluasi									■				■											
Penulisan laporan													■				■							
Seminar hasil																	■							