

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Ruang Lingkup Penelitian

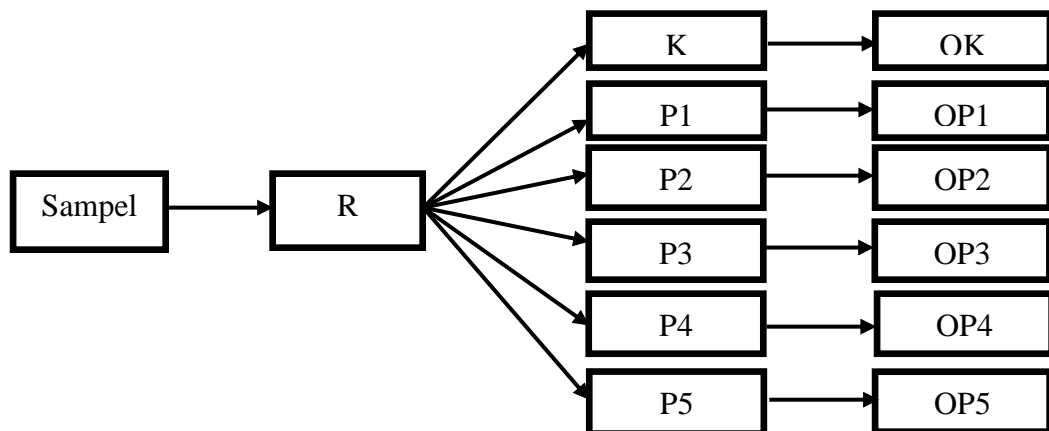
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Farmakologi, Histologi dan Patologi Anatomi.

3.2. Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Untuk pemeliharaan, perlakuan dan pengamatan bertempat di Laboratorium Parasitologi, sedangkan pemeriksaan dan analisis histopatologi dilakukan di Laboratorium Sentral Rumah Sakit Nasional Diponegoro/Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Penelitian ini dilakukan selama 3 bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal.

3.3. Jenis Dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan desain *post test only control group design* pada tikus . Perlakuan yang diberikan yaitu dengan memberikan ekstrak produk X, sedangkan keluarannya (*outcome*) adalah makroskopis dan histopatologi hepar tikus *sprague dawley*.



Gambar 3. Skema Desain Penelitian

Keterangan:

R : Randomisasi

K : Kelompok kontrol, tikus yang tidak diberi ekstrak produk X

P1 : Kelompok perlakuan 1, diberi ekstrak produk X dengan dosis 5 mg/kgBB

P2 : Kelompok perlakuan 2, diberi ekstrak produk X dengan dosis 50 mg/kgBB

P3 : Kelompok perlakuan 3, diberi ekstrak produk X dengan dosis 300 mg/kgBB

P4 : Kelompok perlakuan 4, diberi ekstrak produk X dengan dosis 2000 mg/kgBB

P5 : Kelompok perlakuan 5, diberi ekstrak produk X dengan dosis 5000 mg/kgBB

OK : Observasi kelompok kontrol

OP1: Observasi kelompok 1

OP4: Observasi kelompok 4

OP2: Observasi kelompok 2

OP5: Observasi kelompok 5

OP3: Observasi kelompok 3

3.4. Populasi dan Sampel

3.4.1. Sampel

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah 30 ekor tikus *sprague dawley*. Tikus betina dipilih karena memiliki karakteristik fisiologis dan metabolisme yang hampir sama dengan manusia serta memiliki kerentanan tinggi pada uji toksisitas akut. Sampel penelitian yang digunakan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

3.4.1.1. Kriteria Inklusi

- a) Tikus *sprague dawley* betina
- b) Dewasa (umur 2-3 bulan)
- c) Berat badan 100-150 gram
- d) Kondisi fisik sehat

e) Tidak ada abnormalitas anatomi yang tampak

3.4.1.2. Kriteria Eksklusi

a) Tikus mati atau sakit ketika diaklimatisasi

3.4.1.2. Kriteria Drop Out

a) Perubahan perilaku (tidak mau makan, lemas)

b) Tikus mati saat penelitian.

3.4.2. Cara Sampling

Sampel didapatkan dengan mengalokasikan kelompok berdasarkan cara *random sampling allocation*.

3.4.3. Besar Sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria dari WHO dalam *Research Guideline for Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicines*, yaitu jumlah minimal 5 ekor tiap kelompok. Sehingga didapatkan jumlah sampel keseluruhan adalah 30 ekor tikus .

3.5. Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak produk X.

3.5.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah gambaran morfologi makroskopis dan histopatologi hepar tikus *sprague dawley*.

3.6. Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1.	Ekstrak Produk X	Pemberian ekstrak produk X yaitu berisi: Languatis Rhizoma 40 mg, Zingiberis aromatica Rhizoma 40 mg, Retrofracti Fructus 40 mg, Curcumae Rhizoma 40 mg dan sudah distandarisasi oleh Pabrik X.	Gram	Nominal
2.	Makroskopis tikus <i>sprague dawley</i>	Pemeriksaan secara makroskopis pada permukaan organ hepar tikus dengan membuat sediaan preparat hepar secara makroskopis setelah diberikan perlakuan.	Ordinal	Kategorik
		Pemeriksaan secara makroskopis dengan menggunakan berat hepar tikus setelah diberikan perlakuan.	Rasio	Numerik
3.	Mikroskopis tikus <i>sprague dawley</i>	Penilaian histopatologi hepar secara mikroskopis kerusakan pada sel hepar tikus dengan cara membuat sediaan preparat hepar tikus*	Interval	Numerik

*Keterangan:

- a. Normal : tampak sel berbentuk poligonal, sitoplasma berwarna merah homogen dan dinding sel berbatas tegas
- b. Degenerasi albuminosa : tampak sel membengkak dengan sitoplasma granuler.
- c. Degenerasi hidropik : tampak vakuola pada sitoplasma sel maupun di sekeliling inti sel.
- d. Nekrosis : tampak inti sel piknotik dan sitoplasma sel menggumpal

3.7. Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1. Alat

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah:

1. Kandang tikus

2. Sonde lambung
3. Timbangan
4. Gelas ukur
5. Seperangkat alat bedah minor untuk mengambil organ
6. Alat untuk pembuatan preparat histopatologi
7. Mikroskop
8. Kamera digital

3.7.2. Bahan

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah:

1. Tikus *sprague dawley*
2. Ekstrak produk X
3. Ransum pakan standar untuk hewan coba
4. Aquadest
5. Bahan untuk pembuatan preparat histologi

3.7.3. Jenis Data

Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis hepar setelah pemberian ekstrak produk X merupakan data primer hasil penelitian eksperimental laboratorik yang dilakukan.

3.7.4. Cara dan Skala Pengukuran

Sebelum penelitian, 30 ekor tikus *sprague dawley* diaklimatisasi dalam suasana laboratorium selama 7 hari dengan dilakukan pengandangan, pemberian pakan standar dan diberi air minum *ad libitum*. 30 ekor tikus tersebut dibagi kedalam 6 kelompok. Masing- masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus yang dipilih secara random. Pada hari pertama perlakuan, kelompok perlakuan diberi ekstrak produk X secara peroral dengan menggunakan sonde lambung. Pemberian

dosis toksisitas akut berdasarkan *OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICAL* No. 420 metode *Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure*.³⁸

Tabel 5. Pemberian Dosis Toksik Akut

Kelompok	Perlakuan
Kontrol (K)	Diberi pelarut (aquabestilata)
Perlakuan 1 (P1) 5 mg/kgBB	Diberi ekstrak produk X 5 mg/kgBB
Perlakuan 2 (P2) 50 mg/kgBB	Diberi ekstrak produk X 50 mg/kgBB
Perlakuan 3 (P3) 300 mg/kgBB	Diberi ekstrak produk X 300 mg/kgBB
Perlakuan 4 (P4) 2000 mg/kgBB	Diberi ekstrak produk X 2000 mg/kgBB
Perlakuan 5 (P5) 5000 mg/kgBB	Diberi ekstrak produk X 5000 mg/kgBB

Skala: Nominal (Gram)

Setelah 7 hari dilakukan pengamatan, tikus kemudian diterminasi dan diambil organ heparnya. Dilakukan pengamatan secara makroskopis, hepar diamati sebagai berikut:

1. Gambaran Makroskopis Hepar

- 1) Mengamati gambaran morfologi makroskopis hepar dengan dilakukan pengamatan pada permukaan luar hepar. Pengamatan dilakukan oleh peneliti sendiri. Penilaian morfologi makroskopis hepar dengan kriteria sebagai berikut:

Tabel 6. Skoring penilaian morfologi makroskopis hepar

Luas Daerah	Skor
Normal	0
Abnormal < 25%	1
Abnormal < 26-50%	2
Abnormal < 51-75%	3
Abnormal < 76-100%	4

Skala: Kategorikal (Ordinal)

- 2) Berat Hepar, yaitu pengukuran organ hepar tikus setelah diterminasi dengan timbangan yang sudah ditera.

Skala: Numerik (Rasio)

2. Gambaran Mikroskopis Hepar

Setelah dilakukan pengamatan makroskopis, kemudian dilanjutkan pengamatan secara mikroskopis. Organ hepar tikus dibuat preparat histopatologi dengan pewarnaan HE. Kemudian preparat histopatologi dikirim ke laboratorium histologi untuk diamati. Pengamatan dilakukan oleh peneliti sendiri dengan menggunakan skoring derajat histopatologi sel hepar berdasarkan penilaian menurut kriteria *Manja Roenigk*.⁴⁸

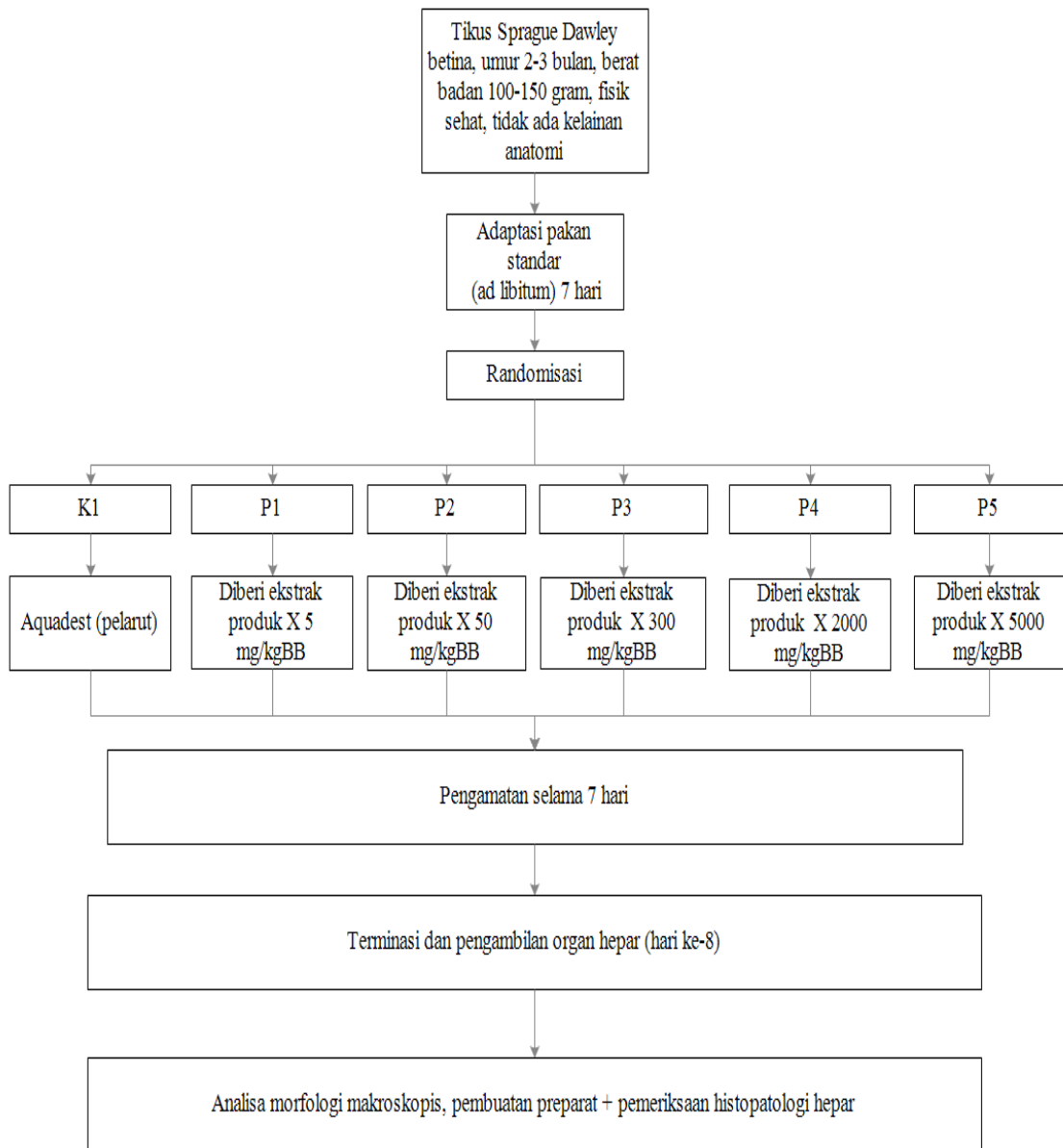
Tabel 7. Skor penilaian Derajat Histopatologi Sel Hepar

Tingkat perubahan	Skor
Normal	1
Degenerasi Albuminosa	2
Degenerasi Hidropik	3
Nekrosis	4

Skala: Numerik (Interval)

Preparat histopatologi hepar diamati di bawah mikroskop cahaya dalam lima lapangan pandang yang berbeda, dengan perbesaran 400 kali. Setiap lapangan pandang dihitung 40 sel hepatosit dan dinilai skor tiap sel. Kemudian dihitung rerata bobot skor perubahan histopatologi hepar dari lima lapangan pandang dari masing-masing tikus.

3.8. Alur Penelitian



Gambar 4. Diagram Alur Penelitian

3.9. Analisis Data

Data yang diperoleh dari semua kelompok sampel diolah dengan program komputer *SPSS for windows*.

- a. Untuk data dengan skala kategorikal, dilakukan uji beda menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan jika didapatkan nilai $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.
- b. Untuk data dengan skala numerik, dilakukan uji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk*. Apabila didapatkan distribusi data yang normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji *One Way Anova* dan jika didapatkan nilai $p < 0,05$, dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc*. Apabila didapatkan distribusi data yang tidak normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan jika didapatkan nilai $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

3.10. Etika Penelitian

Etika penelitian telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan No. 303/EC/FK-RSDK/2016.