

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

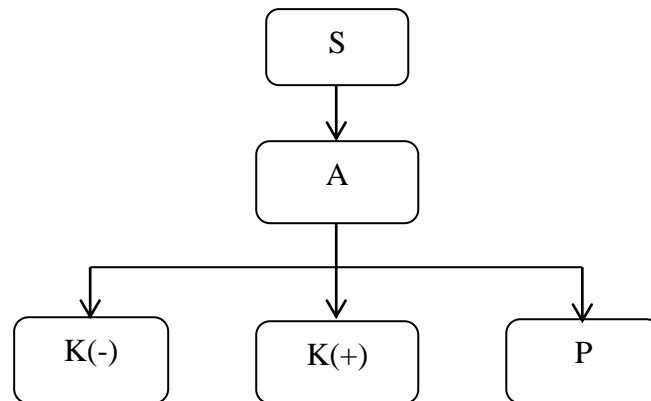
Ruang lingkup penelitian ini adalah Ilmu Patologi Anatomi dan Ilmu Farmakologi.

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Pembuatan spesimen dan pemeriksaan histologi hepar dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang. Pembuatan ekstrak dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang. Penelitian direncanakan selama 8 minggu, dengan pemberian obat 1x seminggu dan ekstrak daun sukun setiap hari selama 8 minggu. Penelitian dilaksanakan pada bulan April hingga Juni 2017.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Jenis penelitian ini adalah true eksperimental dengan desain penelitian *post test only control group design*. Sampel dibagi menjadi 3 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol negatif (K(-)), 1 kelompok kontrol positif (K(+)), dan 1 kelompok perlakuan (P). K(-) merupakan kelompok kontrol negatif yang diberi pakan dan minum standar. K(+) merupakan kontrol positif yang diberi injeksi DEN, dan P merupakan kelompok perlakuan yang diberi injeksi DEN dan diberi ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*).



Gambar 7 Rancangan Penelitian

S : Sampel

A : Aklimatisasi

K(-) : Kontrol negatif. Tikus wistar diberi pakan standar selama 8 minggu berturut-turut.

K(+): Kontrol positif. Tikus wistar diberi pakan standar dan diinjeksi DEN 50 mg/kgBB intraperitoneal 1x seminggu. Selanjutnya tikus diterminasi pada akhir minggu ke-8 dan dilakukan pengambilan organ hepar.

P : Perlakuan. Tikus wistar diberi pakan standar dan diberi ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) 200 mg/kgBB peroral. Selanjutnya tikus diinjeksi DEN 50 mg/kgBB intraperitoneal 1x seminggu dan tikus diterminasi pada akhir hari ke-60, kemudian dilakukan pengambilan organ hepar.

3.4 Populasi dan sampel penelitian

3.4.1 Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah tikus wistar jantan.

3.4.2 Sampel penelitian

Sampel penelitian diambil secara acak dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

3.4.2.1 Kriteria inklusi

- 1) Tikus wistar jantan
- 2) Berat 150-200 gram
- 3) Usia 2-3 bulan
- 4) Sehat dan aktif

3.4.2.2 Kriteria eksklusi

- 1) Tikus mati selama masa penelitian

3.4.3 Cara sampling

Sampling dilakukan secara randomisasi.

3.4.4 Besar sampel

Besar sampel penelitian mengacu pada *Institutional Animal Care and Use Comitee Guidebook* dan *World Health Organization (WHO)* yaitu sebanyak minimal 5 ekor tiap kelompok perlakuan dan menganut prinsip 3R (*Replacement, Reduction and Refinement*), sehingga jumlah sampel yang digunakan yaitu 15 ekor. Untuk mengantisipasi adanya sampel yang *dropout*, maka tiap kelompok ditambah 1 ekor tikus sehingga total sampel menjadi 18 ekor.

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel bebas

- 1) Ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*)
- 2) Dietilnitrosamin

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran fibrosis hepar tikus wistar jantan.

3.6 Definisi operasional

Tabel 2 Definisi operasional

Jenis variabel	Nama variabel	Definisi operasional	Skala
Bebas	Ekstrak daun sukun	Daun yang dipilih merupakan daun yang matang dan berwarna hijau tua. Pembuatan ekstrak daun sukun dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang. Daun sukun dicuci, lalu dikeringkan hingga kadar air <5%. Selanjutnya daun yang sudah kering digiling dengan sampel mill hingga ukuran 40 mesh. Setelah digiling, serbuk daun sukun dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer pelarut diberi 100mL metanol dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam sampel disaring, dan filtrat diuapkan dengan rotari evaporator untuk mendapatkan ekstrak metanol. Lalu ekstrak ditimbang dan disimpan dalam suhu -20°C. Ekstrak dilarutkan dengan menggunakan <i>carboxy methyl cellulose</i> . Tikus diberi ekstrak dengan dosis	Nominal

		200mg/kgBB peroral dengan bantuan sonde.	
Bebas	Dietilnitrosamin	Dietilnitrosamin diberikan secara intraperitoneal dengan dosis 50mg/kgBB 1x seminggu selama 8 minggu	Nominal
Terikat	Fibrosis hepar	Penilaian derajat fibrosis hepar tikus yang telah diberi perlakuan selama 8 minggu. Preparat diamati di 5 lapangan pandang dengan pembesaran 100x. Penilaian derajat fibrosis berdasarkan derajat <i>Laennec</i> . ²¹ Grade 0 : Tidak ditemukan fibrosis Grade 1 : Fibrosis minimal Grade 2 : Fibrosis ringan Grade 3 : Fibrosis sedang Grade 4A: Sirosis, <i>mild definite</i> atau <i>probable</i> Grade 4B : Sirosis sedang Grade 4C: Sirosis berat	Ordinal

3.7 Cara pengumpulan data

3.7.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah hepar tikus wistar yang telah diberi perlakuan, ekstrak metanol daun sukun (*Artocarpus altilis*), DEN, saline, aquadest, makanan tikus, dan reagen untuk membuat spesimen hepar, yaitu larutan buffer formaldehyde 10%, alkohol, dan blok parafin.

3.7.2 Alat

Alat penelitian yang digunakan yaitu kandang tikus, timbangan, scalpel, pinset, sonde, beaker glass, mikrotom, object glass, dan mikroskop untuk pengamatan spesimen, serta alat tulis untuk mencatat hasil penelitian.

3.7.3 Jenis data

Jenis data penelitian ini adalah data primer yang diperoleh dari gambaran fibrosis hepar tikus.

3.7.4 Cara kerja

3.7.4.1 Perlakuan

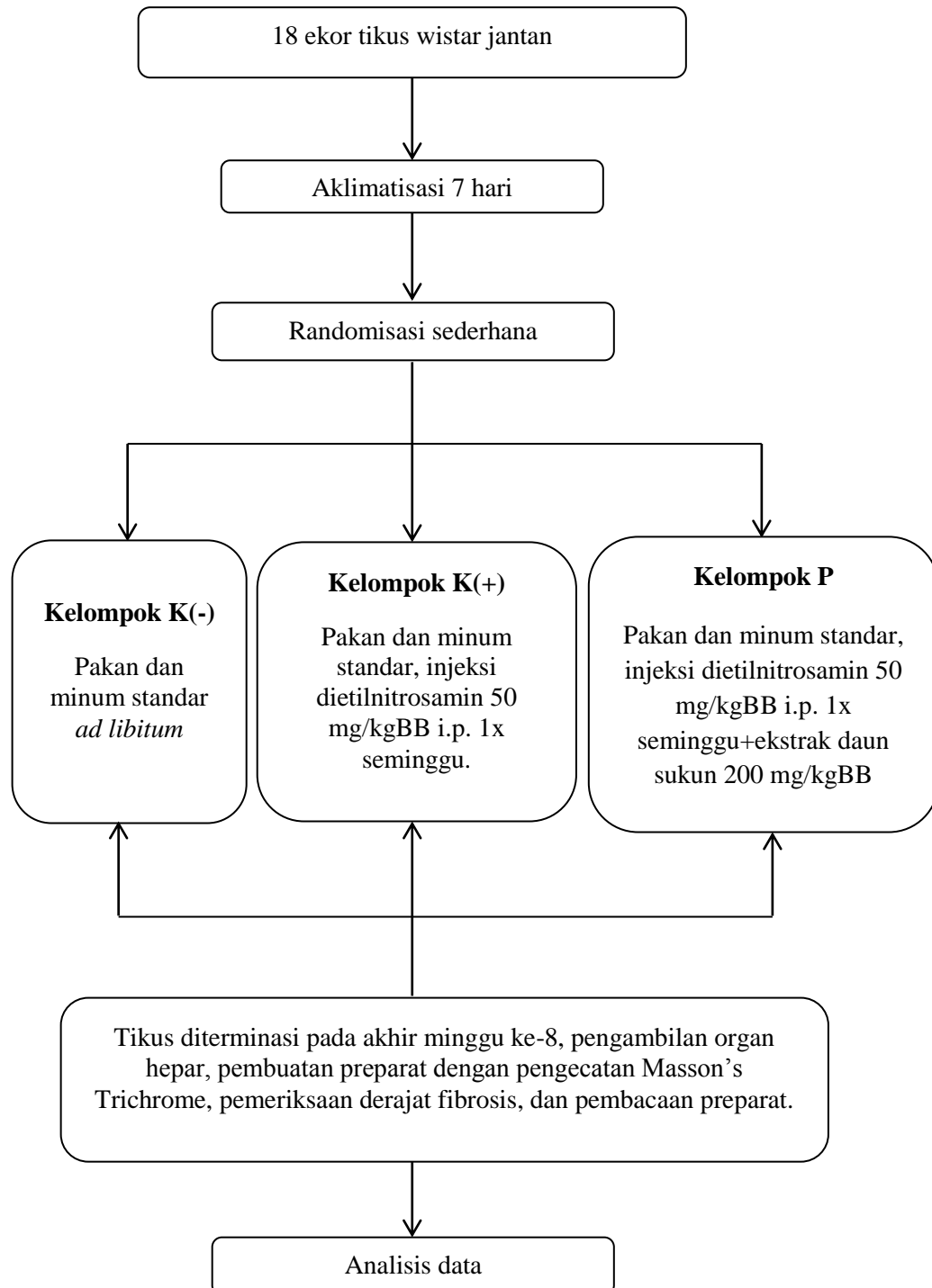
- 1) Sampel penelitian (18 ekor tikus wistar) diadaptasi dan diberi pakan dan minum standar selama 7 hari di laboratorium. Setelah itu tikus dikelompokkan ke dalam 3 kelompok (masing-masing kelompok berjumlah 6 ekor) dengan teknik randomisasi sederhana, yaitu kelompok kontrol negatif (K(-)), kelompok kontrol positif (K(+)), dan kelompok perlakuan.
- 2) Perlakuan diberikan pada tiap kelompok sebagai berikut :
 - Kelompok K(-) : Tikus diberi pakan dan minum standar selama 8 minggu berturut-turut. Pada kelompok kontrol tikus akan diinjeksi dengan saline intraperitoneal.
 - Kelompok K(+) : Tikus diberi pakan standar dan diinjeksi DEN dengan dosis 50mg/kgBB intraperitoneal 1x seminggu selama 8 minggu.
 - Kelompok P : Tikus diberi pakan standar, diinjeksi DEN dengan dosis 50mg/kgBB intraperitoneal 1x seminggu selama 8 minggu, dan diberi ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dengan dosis 200mg/kgBB per oral setiap hari selama 8 minggu.
- 3) Tikus diterminasi pada akhir minggu ke-8 secara *lege artis*. Organ hepar diambil dan segera direndam dalam larutan formalin 10%, lalu dikirim ke

Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Dokter Kariadi untuk dilakukan proses blok parafin. Setelah proses tersebut selesai, blok parafin dipotong dan dilakukan pengecatan *Masson's Trichrome*.²²

3.7.4.2 Proses pemeriksaan derajat fibrosis hepar

Slide diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 100x. Gambaran fibrosis diamati pada 5 lapangan pandang dan besar derajat fibrosis dinilai dengan sistem skoring *Laennec*.²¹

3.8 Alur penelitian



Gambar 8 Alur Penelitian

3.9 Manajemen data dan analisis data

3.9.1 Manajemen data

Data yang sudah terkumpul telah diolah terlebih dahulu melalui beberapa tahap yaitu *editing*, *coding*, *entry*, dan *cleaning*. Selanjutnya data akan dianalisis menggunakan program SPSS.

3.9.2 Analisis data

Kelompok pengukuran dalam penelitian ini berskala kategorikal dan tidak berpasangan serta lebih dari 2 kelompok, maka uji yang digunakan adalah uji Kruskal-wallis. Apabila hasil uji Kruskal-wallis bermakna lalu dilanjutkan dengan uji Mann-whitney. Apabila $p < 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan maka nilai P dianggap bermakna.²³

3.10 Etika penelitian

Sebelum memulai penelitian telah dimintakan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro - Rumah Sakit Dokter Kariadi, Semarang.