

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup keilmuan yang digunakan pada penelitian ini adalah Ilmu Histologi, Patologi Anatomi, dan Farmakologi.

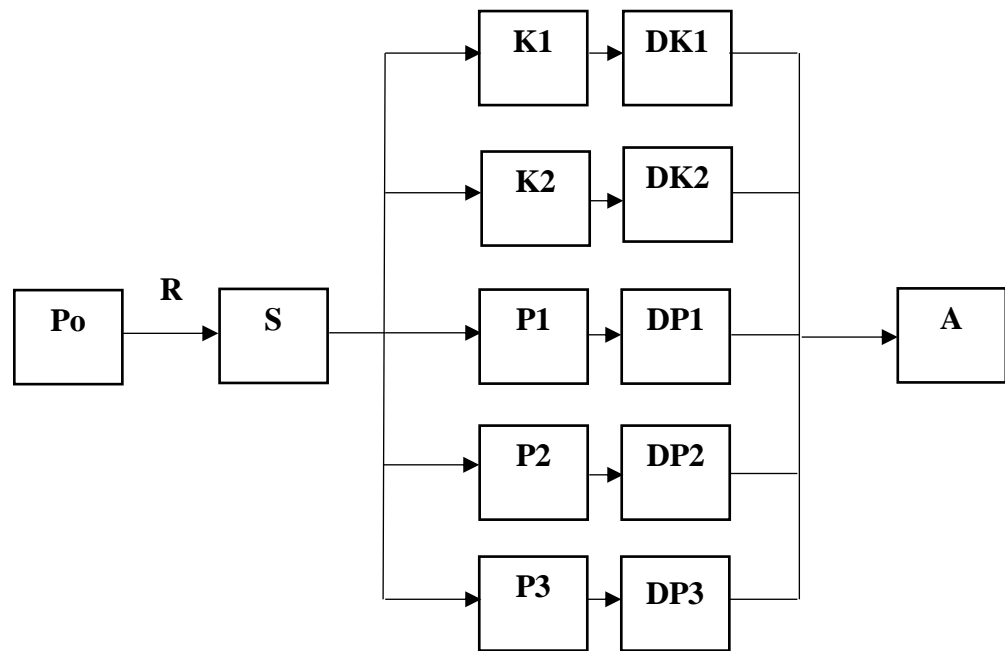
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Pembuatan ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro. Pembuatan spesimen dan pemeriksaan histologis ginjal dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Nasional Diponegoro. Penelitian dilaksanakan selama 8 bulan yaitu pada Bulan Februari hingga Oktober 2017.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan *true experimental* dengan *Post Test Only Control Group Design*, yang menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian. Perlakuan berupa pemberian ekstrak daun sukun dan madu pada tikus wistar jantan yang diinduksi DEN dengan parameter pengukuran variabel terikat yaitu gambaran mikroskopis ginjal. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok, yaitu

kelompok kontrol negatif (K1), kelompok kontrol positif (K2), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3).



Gambar 8. Skema Penelitian

Keterangan:

Po : Populasi

R : Randomisasi

S : Sampel

K : Kelompok Kontrol, yang terdiri dari:

Kelompok K1, berupa pemberian pakan standar selama 8 minggu berturut-turut.

Kelompok K2, berupa pemberian DEN dengan dosis 50mg/kgBB/tikus 1x perminggu selama 8 minggu berturut-turut.

P : Kelompok Perlakuan, yang terdiri dari:

Kelompok P1, berupa pemberian DEN dengan dosis 50mg/kgBB/tikus yang diberikan 1x perminggu selama 8 minggu dan diberi ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dengan dosis 200mg/kgBB setiap hari selama 8 minggu dimulai sejak hari pertama penelitian.

Kelompok P2, berupa pemberian DEN dengan dosis 50mg/kgBB/tikus yang diberikan 1x perminggu selama 8 minggu dan diberi madu dengan dosis 2g/kgBB/tikus setiap hari selama 8 minggu dimulai sejak hari pertama penelitian.

Kelompok P3, berupa pemberian DEN dengan dosis 50mg/kgBB/tikus yang diberikan 1x perminggu selama 8 minggu dan diberi ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dengan dosis 200mg/kgBB dan madu 2g/kgBB/tikus setiap hari selama 8 minggu dimulai sejak hari pertama penelitian.

DK1-DK2 : Data hasil pengamatan histopatologi ginjal tikus K1 dan K2

DP1-DP3 : Data hasil pengamatan histopatologi ginjal tikus P1, P2 dan P3

A : Analisis data

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi dari 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.

3.4.2.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus strain wistar
2. Umur 2-3 bulan
3. Berat badan rata-rata 150-200 gram
4. Tikus dalam keadaan sehat dan aktif

3.4.2.2 Kriteria Eksklusi

Tidak terdapat kriteria eksklusi.

3.4.2.3 Kriteria Drop-Out

Mati selama penelitian

3.4.3 Besar Sampel

Penentuan besar sampel penelitian mengacu pada *Institutional Animal Care and Use Comitee Guidebook* dan *World Health Organization (WHO)* yaitu sebanyak minimal 5 ekor hewan coba tiap kelompok perlakuan dan menganut

prinsip 3R (*Replacement, Reduction, and Refinement*). Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan sehingga jumlah sampel yang digunakan, yaitu 25 ekor hewan coba. Untuk mengantisipasi adanya sampel yang *dropout*, maka tiap kelompok ditambah 1 ekor hewan coba sehingga total sampel menjadi 30 ekor hewan coba.

3.4.4 Cara Sampling

Pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*) untuk menghindari bias karena faktor umur dan berat badan. Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel diambil dari tikus wistar yang sudah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sehingga dianggap cukup homogen.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dan madu.

3.5.2 Variabel Terikat

Gambaran mikroskopis ginjal tikus wistar.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional

Nama Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
Ekstrak daun sukun	Daun yang digunakan adalah daun dewasa dengan ciri berwarna hijau tua, tulang daun keras, terletak pada tangkai ke 2 hingga 4, tekstur berbulu, bergetah, bersih, bebas hama, besar dan lebar. Daun sukun diekstrak dengan pelarut metanol kemudian diuapkan sehingga menghasilkan ekstrak kering (serbuk) daun sukun. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 200mg/kgBB/tikus/hari. Pemberian secara per-oral dengan sonde selama 8 minggu setelah ekstrak dilarutkan dalam CMC (0,5% w/v).	Mililiter	Rasio
Madu	Madu yang digunakan dalam penelitian ini adalah madu murni dengan merek Al-shifa. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2g/kgBB/tikus/hari. ⁵⁴ Pemberian madu dilakukan secara peroral dengan sonde.	Mililiter	Rasio
Gambaran mikroskopis ginjal	Gambaran mikroskopik ginjal tikus wistar jantan yang berupa jumlah kerusakan tubulus (degenerasi dan nekrosis sel epitel) dinilai setelah pengecatan HE dan diamati dengan mikroskop binokuler dengan pembesaran 400x pada lima lapangan pandang, yaitu keempat sudut dan bagian tengah preparat.	-	Interval

Perubahan histopatologi pada ginjal ditentukan menurut metode Veniant *et al* yang telah dimodifikasi :

Tabel 3. Kriteria pembacaan derajat histopatologi ginjal.⁵⁵

Degenerasi	Grade	Nekrosis	Grade
Tidak terjadi perubahan degeneratif	0	Tidak terjadi perubahan nekrotik	0
<25%	1	<25%	1
25%-50%	2	25%-50%	2
50%-75%	3	50%-75%	3
>75%	4	>75%	4

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Alat

1. Kandang hewan coba
2. Timbangan duduk dan timbangan neraca
3. Sonde lambung
4. Alat bedah hewan coba : scalpel, gunting, jarum, dan meja lilin
5. Alat pembuatan preparat histologi: mikrotom, oven, cetakan parafin
6. Alat lihat histopatologik ginjal: deck glass, object glass, mikroskop cahaya
7. Gelas ukur dan pengaduk
8. Pemanas dan pemotong
9. Spuit 3 ml

3.7.2 Bahan

1. Tikus wistar jantan
2. Makanan dan minuman standar hewan percobaan

3. Bahan pengecatan HE

- a. Larutan buffer formalin 10%
- b. Parafin
- c. Albumin
- d. Larutan xylool
- e. Alkohol bertingkat : 70%, 80%, 90%, 96%.
- f. Aquadest
- g. Eter

4. *Carboxymethylcellulosa* (CMC)

5. Ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*)

6. DEN

7. Madu

3.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini merupakan data primer. Data diperoleh langsung dari pemeriksaan mikroskopis terhadap organ ginjal tikus wistar.

3.7.4 Cara Kerja

Cara kerja dalam penelitian ini meliputi langkah-langkah sebagai berikut:

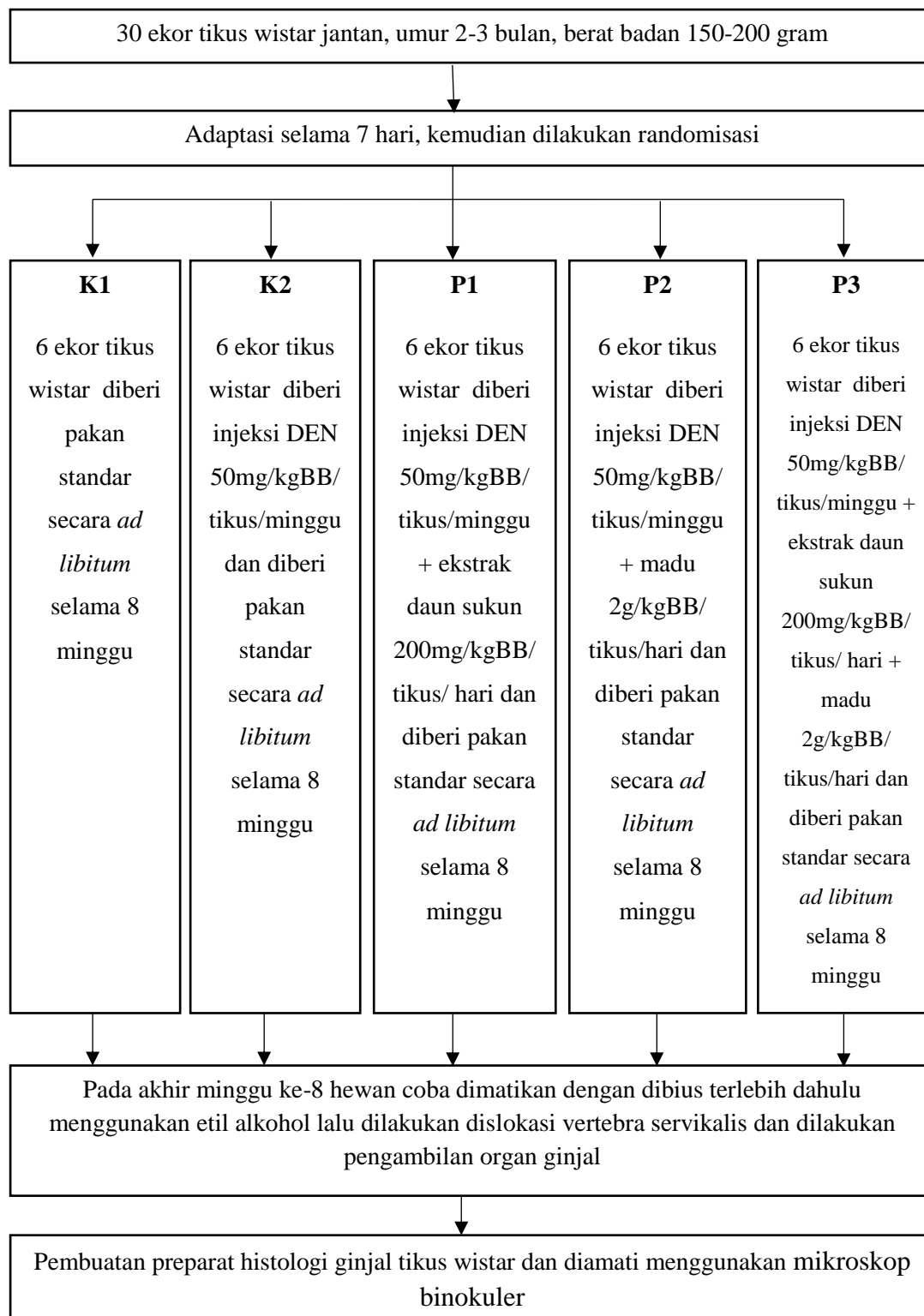
1. Melakukan aklimatisasi hewan sampel di laboratorium selama 1 minggu
2. Memilih sampel dengan metode *simple random sampling*. 30 ekor tikus wistar jantan dibagi dalam 5 kelompok. Masing-masing kelompok tikus wistar dikandangan secara individual.

3. Mempersiapkan DEN dengan dosis 50mg/kgBB/tikus/minggu dan ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dengan dosis 200mg/kgBB/tikus/hari dan madu dengan dosis 2g/kgBB/tikus/hari
4. Memberi perlakuan selama 8 minggu pada tiap kelompok yaitu:
 - a. Kelompok K1, berupa pemberian pakan standar selama 8 minggu berturut-turut.
 - b. Kelompok K2, berupa pemberian DEN dengan dosis 50mg/kgBB/tikus 1x perminggu selama 8 minggu berturut-turut.
 - c. Kelompok P1, berupa pemberian DEN dengan dosis 50mg/kgBB/tikus yang diberikan 1x perminggu selama 8 minggu dan diberi ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dengan dosis 200mg/kgBB setiap hari selama 8 minggu dimulai sejak hari pertama penelitian.
 - d. Kelompok P2, berupa pemberian DEN dengan dosis 50mg/kgBB/tikus yang diberikan 1x perminggu selama 8 minggu dan diberi madu dengan dosis 2g/kgBB/tikus setiap hari selama 8 minggu dimulai sejak hari pertama penelitian.
 - e. Kelompok P3, berupa pemberian DEN dengan dosis 50mg/kgBB/tikus yang diberikan 1x perminggu selama 8 minggu dan diberi ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dengan dosis 200mg/kgBB dan madu 2g/kgBB/tikus setiap hari selama 8 minggu dimulai sejak hari pertama penelitian
5. Melakukan terminasi semua hewan coba pada akhir minggu ke-8 penelitian dengan membius terlebih dahulu menggunakan etil alkohol, lalu melakukan dislokasi vertebra servikalis, kemudian membedah dan mengambil organ ginjal.

Organ ginjal hewan percobaan diiris memanjang hingga terbelah dua kemudian difikasi menggunakan larutan buffer formalin 10%, setelah itu dibuat preparat histologi dengan metode blok parafin dan diberi pengecatan HE.

6. Mengamati struktur mikroskopis ginjal dengan mikroskop cahaya binokular dengan perbesaran 400x pada 5 lapangan pandang, yaitu keempat sudut dan bagian tengah preparat. Pengamatan dilakukan oleh pengamat ahli dan peneliti secara blinding untuk menghindari subjektifitas.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 9. Alur penelitian

3.9 Analisis Data

Jenis rancangan hipotesis yang digunakan pada penelitian ini adalah hipotesis komparatif numerik dengan lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan. Data yang diperoleh diolah dengan program komputer SPSS dan dilihat normal tidaknya distribusi data dengan uji *Shapiro-Wilk*. Hasil uji *Shapiro-Wilk* didapatkan data berdistribusi tidak normal oleh karena itu data ditransformasi. Hasil uji normalitas setelah dilakukan transformasi tetap didapatkan data berdistribusi tidak normal sehingga uji statistik dilanjutkan dengan uji *Kruskall-Wallis*. Hasil uji beda menggunakan uji statistik non parametrik *Kruskall-Wallis* didapat $p \leq 0,05$. Uji statistik kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui antar kelompok mana yang terdapat perbedaan secara bermakna.

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance telah didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP dr Kariadi Semarang dengan nomor 50/EC/H/FK-RSDN/VII/2017 pada tanggal 11 Juli 2017.