

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup keilmuan dari penelitian ini adalah Histologi, Patologi Anatomi, dan Farmakologi.

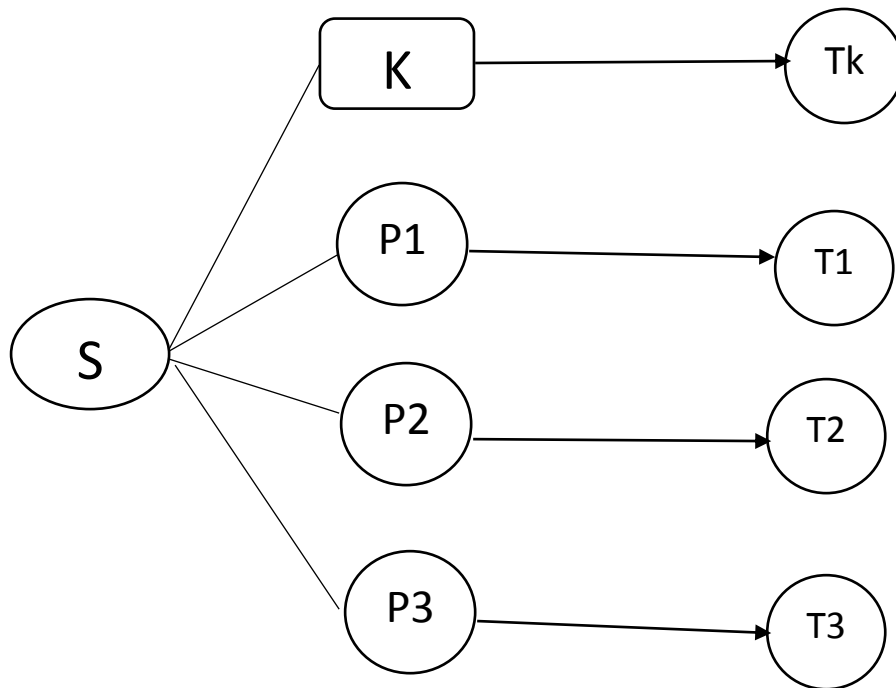
3.2 Ruang Lingkup Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2017 hingga Juni 2017 di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, sedangkan interpretasi hasil mikroskopis sampel jaringan hepar dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true eksperimental* dengan desain yang dipakai adalah *Post Test Only with Control Group Design* yang menggunakan hewan coba berupa mencit Balb/c sebagai objek penelitian. Perlakuan pada mencit Balb/c usia 3-4 bulan dengan berat badan 30-40 gram yang diberi ekstrak cabai rawit. Output yang dinilai adalah gambaran mikroskopis hepar mencit Balb/c.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut :



Keterangan:

S = Kelompok Sampel

K = Kelompok kontrol

P1 = Kelompok perlakuan I (ekstrak cabai rawit peroral 10 mg/kg BB/hari)

P2 = Kelompok perlakuan II (ekstrak cabai rawit peroral 20 mg/kg BB/ hari)

P3 = Kelompok Perlakuan III (ekstrak cabai rawit peroral 40 mg/kg BB/hari)

Tx = Tes Kelompok kontrol

T1 = Tes Kelompok Perlakuan I

T2 = Tes Kelompok Perlakuan II

T3 = Tes Kelompok Perlakuan III

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Target

Populasi target penelitian ini adalah mencit Balb/c.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah mencit Balb/c umur 3-4 bulan

3.4.3 Sampel Penelitian

Mencit Balb/c dengan berat badan 30-40 gram yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Fakultas kedokteran Universitas Diponegoro. Mencit Balb/c usia 3-4 bulan dengan berat badan 30-40 gram yang memenuhi kriteria penelitian. Kriteria penelitian adalah sebagai berikut:

3.4.3.1 Kriteria Inklusi

- a) Mencit Balb/c.
- b) Jantan.
- c) Usia 3-4 bulan.
- d) Berat badan 30-40 gram.
- e) Sehat (aktif dan tidak cacat).

3.4.3.2 Kriteria eksklusi

- a) Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.

3.4.3.3 Kriteria drop out

a) Mati selama proses perlakuan.

3.4.4 Cara Pengambilan Sampel

Sampel penelitian diambil secara acak dengan metode randomisasi sederhana (*simple random*) dari populasi terjangkau yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak memenuhi kriteria eksklusi dan drop out.

3.4.5 Besar Sampel

Berdasarkan kriteria WHO setiap kelompok terdiri dari minimal 5 binatang coba. Penelitian ini menggunakan 20 ekor mencit Balb/c yang dibagi ke dalam 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol dengan jumlah 5 ekor tiap kelompok.²⁹

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak cabai rawit.

3.5.2 Variabel terikat

Variabel tergantung penelitian ini adalah gambaran mikroskopis hepar mencit Balb/c.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Skala
A.	Variabel Bebas	Definisi Operasional	Skala
1.	Ekstrak cabai rawit	Ekstrak cabai yang mengandung kapsaisin dengan dosis bertingkat. Dosis dimulai dari 10 mg/kg BB diberikan kepada kelompok mencit Balb/C perlakuan 1 (P1), dosis 20 mg/kg BB diberikan kepada mencit Balb/C perlakuan 2 (P2), dosis 40 mg/kg BB diberikan kepada mencit Balb/C perlakuan 3 (P3). Pemberian dengan bantuan sonde satu kali dalam satu kali dalam sehari selama 14 hari.	Nominal
B.	Variabel Terikat		
1.	Gambaran mikroskopis hepar mencit Balb/c.	Gambaran mikroskopis hepar mencit Balb/c di bawah mikroskop setelah dilakukan pengecatan dengan <i>Hematoxylin Eosin</i> . Perubahan gambaran histopatologi diamati di daerah vena sentralis. Diamati di 5 lapangan pandang yang berbeda dengan perbesaran 400 kali. Gambaran mikroskopis hepar mencit Balb/c dinilai dengan cara menghitung tingkat kerusakan hepatosit berdasarkan kerusakan struktur histologi sel hepar menurut <i>Manja Roenigk</i> sebagai berikut:	Nominal

1) Skor 1 (normal)

Tampak sel berbentuk polygonal, sitoplasma berwarna merah homogeny, dinding sel berbatas tegas.

2) Skor 2 (Degenerasi parenkimatososa)

Pembengkakan sel disertai sitoplasma keruh bergranula.

3) Skor 3 (Degenerasi hidropik)

Tampak sel sembab, akumulasi cairan dan terdapat banyak vakuola.

4) Skor 4 (Nekrosis)

Kerusakan permanen atau kematian sel, terdapat 3 bentuk yaitu:

- Piknotik : tampak inti sel kecil warna gelap (basofilik) dan sitoplasma sel kemerahan.
- Karioreksis : sel mengecil, kontur sel ireguler, fragmentasi inti sel menjadi beberapa bagian kecil.
- Kariolisis : inti sel hilang.

Skoring derajat histopatologi hepar yang dilakukan berdasarkan uji skoring penelitian *Histopathology Liver Induced Drug Manja Roenigk*.³⁰ Uji ini dilakukan dengan membuat skor pada setiap kerusakan hepatosit.

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan Penelitian

1. Mencit Balb/c
2. Makanan dan minuman mencit Balb/c
3. Ekstrak cabai rawit
4. Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan:
 - a. Larutan buffer formalin 10%
 - b. Hematoksin Eosin
 - c. Larutan xylol
 - d. Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%
 - e. Aquadest

3.7.2 Alat Penelitian

3.7.2.1 Alat untuk Memberikan Perlakuan

- 1) Kandang untuk mencit Balb/c
- 2) Sonde
- 3) Gelas ukur
- 4) Spuit 1 cc (tuberculin)

3.7.2.2 Alat untuk Terminasi

- 1) Skalpel
- 2) Pinset chirurgis

- 3) Gunting operasi lurus tajam/tumpul
- 4) Botol kaca untuk menyimpan organ

3.7.2.3 Alat untuk pemeriksaan Histopatologi

- 1) Mikroskop binokuler
- 2) *Object glass* dan *deck glass*
- 3) Kamera digital

3.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan dari penelitian ini adalah data primer hasil pengamatan gambaran mikroskopis hepar mencit Balb/c dari kelompok pemberian ekstrak cabai rawit peroral dosis bertingkat.

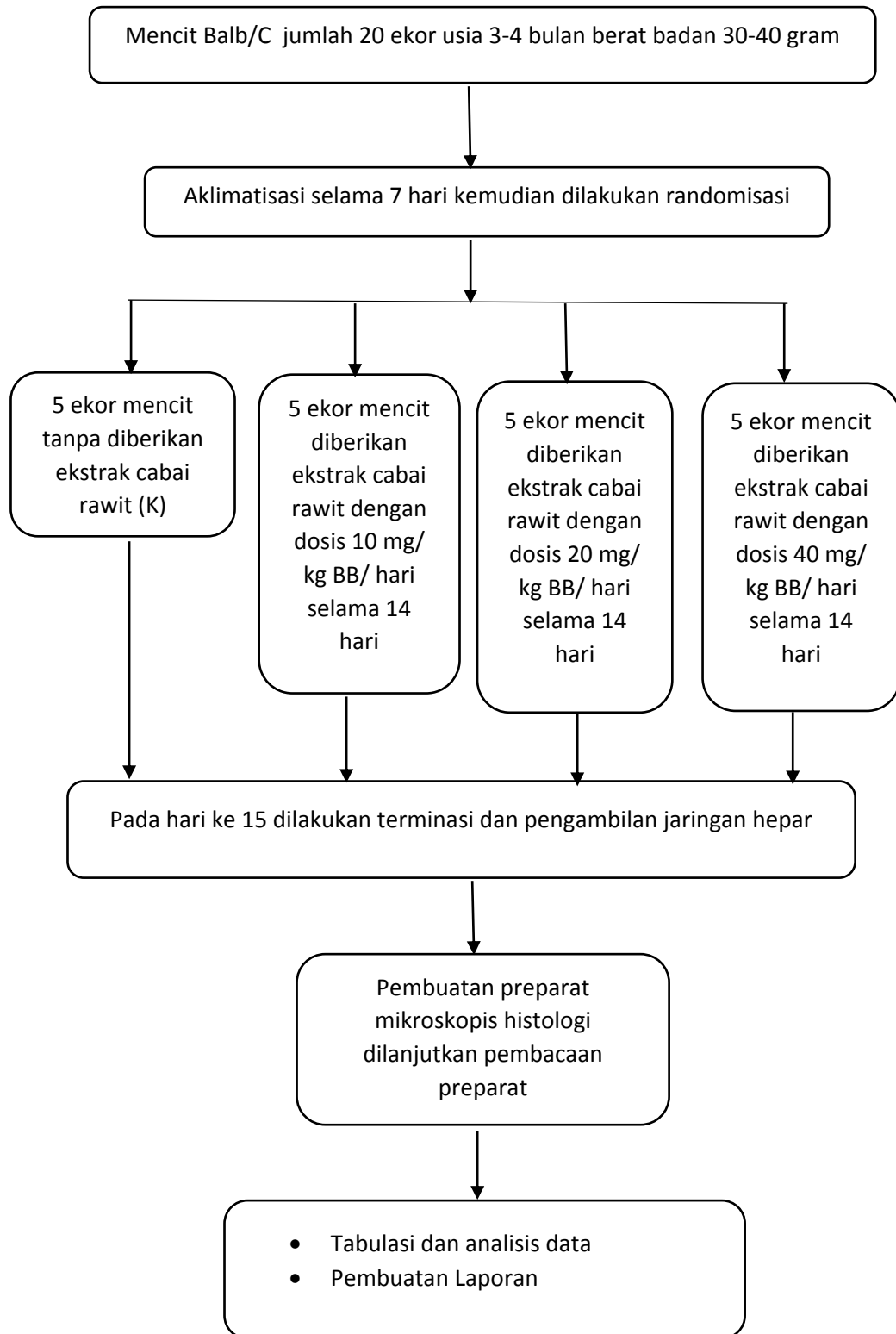
3.7.4 Cara Kerja

- 1) Dua puluh ekor mencit Balb/c yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang tunggal dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*.
- 2) Pada hari ke delapan, mencit Balb/c dibagi menjadi empat kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit Balb/c yang dipilih secara acak.
- 3) Menimbang berat badan masing-masing mencit.
- 4) Mulai hari ke-8 selama 14 hari pada kelompok pertama adalah kelompok kontrol yang diberikan aquadest 1 ml dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok 1 diberikan ekstrak cabai rawit dengan dosis 10 mg/ kg BB/ hari diberikan

dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok II diberikan ekstrak cabai rawit dengan dosis 20 mg/kg BB/ hari diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok III diberikan ekstrak cabai rawit dengan dosis 40 mg/kg BB/ hari, pakan standar dan minum *ad libitum*.

- 5) Mencit Balb/c dinarkose terlebih dahulu lalu dimatikan dengan cara dislokasi leher.
- 6) Mengambil organ hepar. Sampel hepar tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopis selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet buffer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian hepar dan 9 bagian buffer formalin 10%.
- 7) Meletakkan tabung yang berisi sampel hepar mencit Balb/c ke rak tabung, kemudian diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode baku Histologi dengan pewarnaan Hematoksin Eosin. Dari setiap sampel hepar dibuat preparat preparat dan akan dibaca dalam lima lapangan pandang yaitu dari keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan perbesaran 400x. Pembacaan preparat dari lima lapangan pandang tersebut kemudian dicari rerata skor untuk penilaian satu mencit. Sasaran yang dibaca adalah perubahan abnormal gambaran mikroskopis pada hepar yaitu degenerasi dan nekrosis.

3.8 Alur Penelitian



3.9 Analisis Data

Jenis rancangan hipotesis yang digunakan pada penelitian ini adalah hipotesis komparatif dengan skala pengukuran numerik, lebih dari 2 kelompok data. dengan lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan. Data yang diperoleh akan diolah dengan program komputer SPSS 21.0 dan dilihat distribusi datanya normal atau tidak dengan uji *Shapiro-Wilk*. Bila distribusi datanya normal, varians datanya sama, diuji beda dengan menggunakan statistik parametrik *One Way Anova*, jika $p \leq 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Bila distribusi datanya tidak normal, atau varians data tidak sama, maka ditransformasi. Jika setelah ditransformasi tetap didapatkan distribusi data yang tidak normal atau tidak sama, maka dilakukan uji beda menggunakan statistic non parametric *Kruskal-Wallis*, jika didapat $p \leq 0,05$ dilanjutkan uji *Post Hoc (Mann Whitney test)*.

- a. Jika $p \leq 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna
- b. Jika $p > 0,005$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna

Jika didapatkan hasil yang berbeda bermakna, maka ada perbedaan yang bermakna secara mikroskopis hepar mencit Balb/c pada pemberian ekstrak cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) dosis bertingkat selama 30 hari.

Jika didapatkan hasil yang tidak berbeda bermakna, maka tidak ada perbedaan yang bermakna gambaran mikroskopis hepar mencit Balb/c

pada pemberian ekstrak cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) dosis bertingkat.

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance telah diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dengan nomor 32/EC/H/FK-RSDK/2017. Mencit Balb/c dipelihara di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Hewan diberi makan dan minum *ad libitum*. Untuk perlakuan, ekstrak cabai rawit dosis bertingkat diberikan dengan sonde dengan dosis berbeda-beda. Pemberian dengan sonde dilakukan secara lege artis. Hewan dideterminasi dengan cara dislokasi leher dengan sebelumnya dilakukan narkose terlebih dahulu. Pemberian preparat sesuai dengan metode baku mikroskopis pemeriksaan jaringan. Setelah perlakuan, dideterminasi, dan diambil organnya, mencit dikuburkan dengan baik. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti.