III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode acak terkontrol dengan pola *post test–only control group design*. Sampel peneltitian menggunakan 20 ekor tikus putih yang telah diinduksi DMBA dan 5 ekor tikus putih normal galur *Sprague dawley* berumur 5 minggu yang dipilih secara *random* yang dibagi menjadi 5 kelompok.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di *Animal House* Fakultas Kedokteran UNILA, sedangkan pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan selama 15 hari di bulan Oktober dan November 2013.

C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* berumur 5 minggu yang diperoleh dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor.

Tikus putih (Rattus norvegicus) galur Sprague Dawley merupakan tikus yang paling sering digunakan untuk percobaan. Tikus ini memiliki temperamen yang tenang sehingga mudah dalam penanganan. Tikus ini jarang hidup lebih dari 3 tahun (Putra, 2009).

Sampel penelitian yang digunakan sebanyak 25 ekor tikus yang dipilih secara acak dan dibagi dalam 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali (n=5), sesuai dengan rumus Frederer. Menurut Frederer , rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah:

$$(t–1)\ (r–1)>15$$

Dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampel menjadi:

$$(5–1)\ (r–1)>15$$

$$4n–4>15$$

$$4n>19$$

$$n>4,75$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 5 ekor (n>4,75) dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 5 kelompok sehingga penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih dari populasi yang ada.

D. Kriteria Inklusi dan Ekslusi

1. Kriteria inklusi
   a. Aktif bergerak
   b. Memiliki berat badan 180–200 gram
   c. Berusia 5 minggu

2. Kriteria ekslusi
   1. Tampak sakit (penampakan rambut kusam, rontok, atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, genital)
   2. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium
   3. Mati selama masa pemberian perlakuan

E. Alat dan Bahan

1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan ada dua yaitu DMBA dengan dosis 30 mg/kgBB dan ekstrak mahkota dewa (*Phaleria macrocarfa*) dengan dosis 24 mg, 48 mg, dan 96 mg.

2. Bahan Kimia

Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi dengan metode paraffin meliputi: larutan formalin 10% untuk fiksasi, alkohol 70%, alkohol 96%, alkohol absolut, etanol, xylol, pewarna hematoksilin dan eosin, dan entelan.

3. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

a. Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g, untuk menimbang berat tikus.
b. Spuit oral 1 cc
c. *Minor set* untuk pembedahan tikus
d. Kandang tikus
e. Botol minuman tikus
f. Mikroskop cahaya
g. Kamera digital

4. Alat Pembuat Preparat Histopatologi

Alat pembuat preparat histopatologi yang digunakan adalah *object glass, deck glass, tissue cassette, rotarymicrotome, oven, water bath, platening table, autochnicom processor, staining jar, staining rak,* kertas saring, *histoplast,* dan *parafin dispenser.*

F. Prosedur Penelitian

1. Prosedur Pemberian Ekstrak Etanol 70% Buah Mahkota Dewa

Proses pembuatan ekstrak buah mahkota dewa dalam penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut. Ekstraksi dimulai dari penimbangan daun mahkota dewa. Selanjutnya seluruh bagian tumbuhan dikeringkan dalam almari pengering, dibuat serbuk dengan menggunakan *blender* atau mesin penyerbuk. Etanol dengan kadar 70% ditambahkan untuk melakukan ekstraksi dari serbuk ini selama kurang lebih 2 (dua) jam kemudian dilanjutkan maserasi selama 24 jam. Setelah masuk ke tahap filtrasi, akan diperoleh filtrat dan residu. Filtrat yang didapatkan akan diteruskan ke tahap evaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 40^0C sehingga akhirnya diperoleh ekstrak kering (Sulistianto dkk., 2004).

2. Prosedur Pemberian Dosis Ekstrak Etanol 70% Buah Mahkota Dewa

Dosis ekstrak buah mahkota dewa pada ekperimen ini adalah 120 mg/kgBB yang didapat dari dosis mencit pada penelitian sebelumnya yang telah dikonversi ke dosis manusia terlebih dahulu (Rahmawati dkk., 2006).

Dosis tikus (200g)	= 120 mg/kgBB /1000
	= 0,12 mg/gBB x 200
	= 24 mg/200gBB

Dosis untuk 200g tikus adalah 24 mg/200gBB. Dalam penelitian ini kelompok kontrol negatif dan kontrol positif tidak diberikan ekstrak etanol 70% buah mahkota dewa. Dosis awal ekstrak etanol 70% buah mahkota dewa diambil dari dosis normal tikus, sedangkan dosis kedua diambil dari hasil pengalian 2x dosis pertama dan dosis ketiga diambil dari hasil pengalian 4x dari dosis awal.

Jadi, dosis yang digunakan untuk tiap tikus pada kelompok III adalah sebanyak 24 mg/200gBB, pada kelompok IV adalah 48 mg/200gBB, dan pada kelompok V adalah 96 mg/gBB.

Volume ekstrak etanol 70% buah mahkota dewa diberikan secara oral sebanyak 1 ml yang merupakan volume yang boleh diberikan berdasarkan pada volume normal lambung tikus yaitu 3–5 ml. Jika volume ekstrak

melebihi volume lambung, dapat berakibat dilatasi lambung secara akut yang dapat menyebabkan robeknya saluran cerna (Ngatidjan, 2006).

3. Prosedur Pemberian Dosis DMBA

Dosis DMBA yang digunakan dalam penelitian ini adalah dosis tunggal 30mg/kgBB intraperitoneal. Dosis ini merupakan dosis karsinogenik pada tikus.

4. Prosedur Penelitian

a. Tikus sebanyak 25 ekor, dikelompokkan dalam 5 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol normal, hanya yang diberi aquades dan pakan protein 14% untuk riset. Kelompok II sebagai kontrol patologis, diinduksi DMBA dengan dosis 30 mg/kgBB. Kelompok III adalah kelompok yang telah diinduksi DMBA 30 mg/kgBB dan diberikan ekstrak mahkota dewa dosis 24 mg, kelompok IV telah diinduksi dmba 30 mg/kgBB dan diberikan ekstrak mahkota dewa dengan dosis 48 mg, dan kelompok V telah diinduksi DMBA dan diberikan ekstrak mahkota dewa dengan dosis 96 mg. Masing–masing mahkota dewa diberikan secara peroral selama 15 hari
b. Setelah 15 hari, perlakuan dihentikan
c. Selanjutnya tikus dianastesi kemudian dilakukan dekapitasi dan dilakukan pembedahan

d. Setelah dilakukan laparotomi untuk mengambil organ hepar tikus, bangkai tikus dimusnahkan dengan cara pembakaran di tempat khusus.

5. Dilakukan pemeriksaan morfologi hepar secara mikroskopis

a. Teknik pembuatan preparat:

1) *Fixation*

a) Memfiksasi spesimen berupa potongan organ hepar yang telah dipilih segera dengan larutan pengawet formalin 10%

b) Mencuci dengan air mengalir

2) *Trimming*

a) Mengecilkan organ ±3 mm

b) Memasukkan potongan organ hepar tersebut ke dalam *embedding cassette*

3) Dehidrasi

a) Menuntaskan air dengan meletakkan *embedding cassette* pada kertas tisu

b) Berturut–turut melakukan perendaman organ hepar dalam alkohol bertingkat 70%, 96%, alkohol absolut I, II, III masing–masing selama 1 jam

c) *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan xilol I, II, III masing–masing selama 30 menit

4) *Impregnasi*

Impregnasi dengan menggunakan paraffin I dan II masing–masing selama 1 jam di dalam inkubator dengan suhu 65,1^{0}C

5) *Embedding*

a) Menuangkan paraffin cair dalam pan

b) Memindahkan satu persatu dari *embedding cassette* ke dasar pan

c) Melepaskan paraffin yang berisi potongan hepar dari pan dengan memasukkan ke dalam suhu 4–6^0 C beberapa saat

d) Memotong paraffin sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan scalpel/pisau hangat

e) Meletakkan pada balok kayu, ratakan pinggirnya dan buat ujungnya sedikit meruncing

f) Memblok paraffin siap dipotong dengan mikrotom

6) *Cutting*

a) Sebelum memotong, mendinginkan blok terlebih dahulu

b) Melakukan pemotongan kasar, dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4–5 mikron

c) Memilih lembaran potongan yang paling baik, mengapungkan pada air dan menghilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yan lain ditarik menggunakan kuas runcing

d) Memindahkan lembaran jaringan ke dalam *water bath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna

e) Dengan gerakan menyendok mengambil lembaran jaringan tersebut dengan *slide* bersih dan menempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah, mencegah jangan sampai ada gelembung udara di bawah jaringan

f) Mengeringkan *slide*. Jika sudah kering, *slide* dipanaskan untuk merekatkan jaringan dan sisa paraffin mencair sebelum pewarnaan

g) *Staining* (pewarnaan) dengan *Harris Hematoxylin Eosin*

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, memilih *slide* yang terbaik selanjutnya secara berurutan memasukkan ke dalam zat kimia di bawah ini dengan waktu sebagai berikut :

Untuk pewarnaan, zat kimia yang pertama digunakan xilol I, II, III masing–masing selama 5 menit. Kedua, zat kimia yang digunakan alkohol absolut I, II, III masing–masing selama 5 menit. Zat kimia yang ketiga aquades selama 1 menit. Keempat, potongan organ di masukkan dalam zat warna *Harris Hematoxylin* selama 20 menit.

Kemudian memasukkan potongan organ dalam Eosin selama 2 menit. Secara berurutan memasukkan potongan organ dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 96%, alkohol absolut III

dan IV masing–masing selama 3 menit. Terakhir, memasukkan dalam xilol IV dan V masing–masing 5 menit.

7) *Mounting*

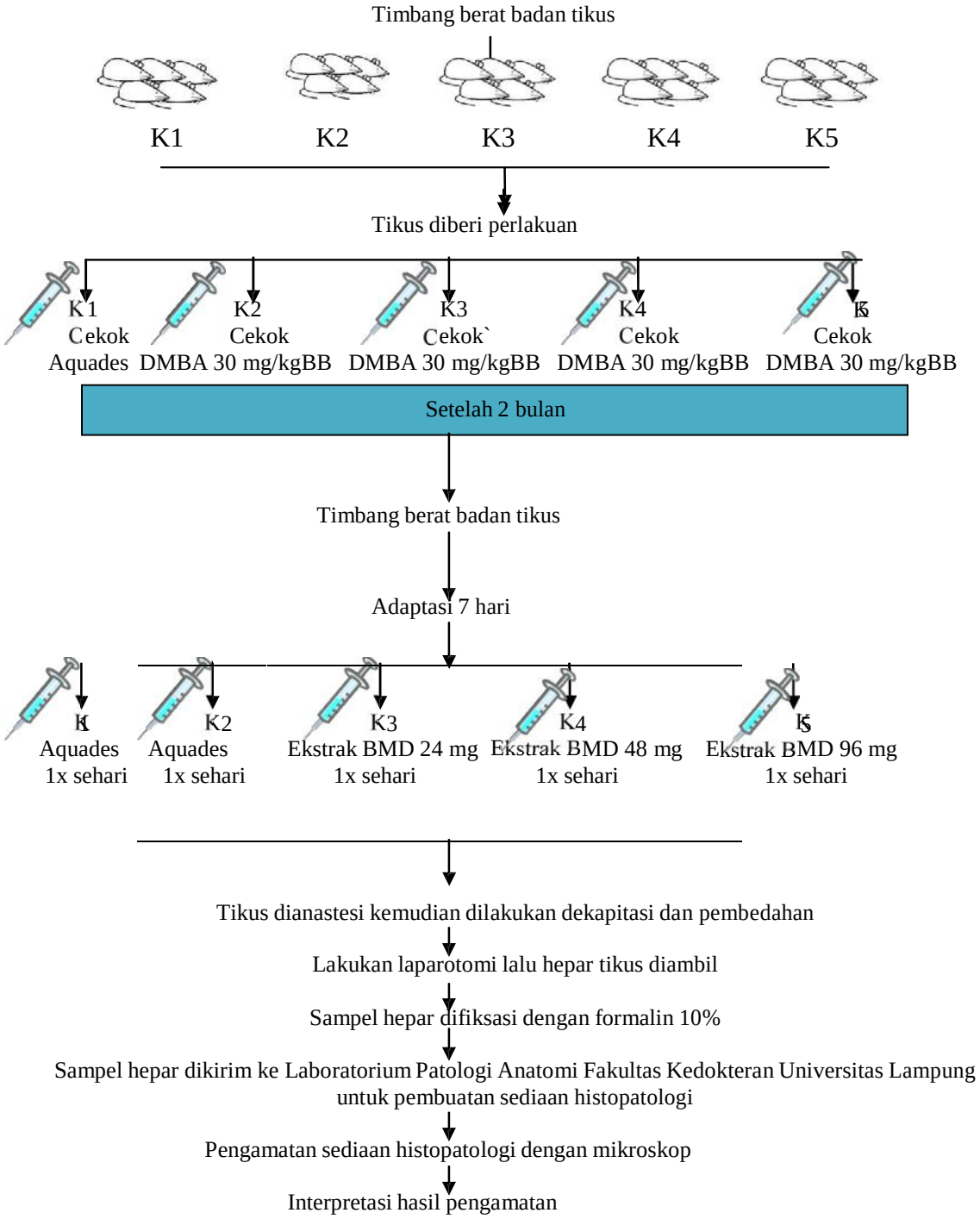
Setelah pewarnaan selesai menempatkan *slide* diatas kertas tisu pada tempat datar, menetesi dengan bahan *mounting* yaitu kanada balsam dan tutup dengan *cover glass* cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

8) Membaca *slide* dengan mikroskop

Slide diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Preparat histopatologi dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi untuk dikonsultasikan dengan ahli patologi anatomi. Gambaran kerusakan hepatosit tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x pada 5 lapangan pandang dimana setiap lapangan pandang diamati berupa infiltrasi sel radang yang terjadi pada hepatosit. Skala degenerasi bengkak keruh kemudian dihitung secara semikuantitatif dalam 5 lapang pandang berbeda.

Tabel 1. Skor penilaian derajat peradangan

Tingkat Perubahan	Skor
Tidak ada hepatosit yang mengalami peradangan	0
<10% hepatosit yang mengalami peradangan	1
10–33% hepatosit yang mengalami peradangan	2
34–66% hepatosit yang mengalami peradangan	3
>66–100% hepatosit yang mengalami peradangan	4



Gambar 5. Diagram Alur Penelitian.

G. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel
   a. Variabel independen adalah pemberian ekstrak mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)
   b. Variabel dependen adalah gambaran mikroskopis hepar
2. Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Definisi operasional variabel

Variabel	Definisi	Skala
Dosis ekstrak mahkota dewa	Dosis efektif mahkota dewa adalah 24 mg • Kelompok I (kontrol negatif) = pemberian aquades • Kelompok II (kontrol positif) = pemberian DMBA 30 mg/kgBB • Kelompok III (perlakuan coba) = pemberian mahkota dewa dosis 24 mg + DMBA 30 mg/kgBB • Kelompok IV (perlakuan coba) = pemberian mahkota dewa dosis 48 mg + DMBA 30 mg/kgBB • Kelompok V (perlakuan coba) = pemberian mahkota dewa dosis 96 mg + DMBA 30 mg/kgBB	Kategorik
Gambar histopatologi hepar tikus	Gambaran kerusakan hepatosit tikus dilihat dengan melakukan pengamatan sediaan histopatologi menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x pada 5 lapangan pandang dimana setiap lapangan pandang diamati sel radang yang terjadi pada hepatosit	Numerik

H. Analisis Data

Analisis data penelitian diproses dengan program SPSS versi 20.0 for windows dengan tingkat signifikansi p=0,05, langkah–langkahnya sebagai berikut:

1. Uji normalitas Data (p>0,05)

   Pengujian normalitas data menggunakan *Shapiro Wilk test* untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak normal. Hasil uji normalitas ini untuk menentukan analisis berikutnya, yaitu analisis parametrik bila data berdistribusi normal atau non parametrik bila data tidak berdistribusi normal.

2. Uji Homogenitas data (p>0,05)

   Pengujian homogenitas data menggunakan uji Levene's untuk mengetahui data homogen atau tidak homogen. Hasil uji homogenitas ini untuk menentukan analisis berikutnya, yaitu analisis parametrik bila data homogen atau non parametrik bila data tidak homogen.

3. Uji parametrik (*One–Way ANOVA*)

   Untuk menguji perbedaan pengaruh kelompok I, kelompok II, kelompok III, kelompok IV, kelompok V.

4. Uji non–parametrik (*Kruskal Wallis*)

   Untuk menguji perbedaan pengaruh kelompok I, kelompok II, kelompok III, kelompok IV, kelompok V dan merupakan uji alternatif dari *One–Way ANOVA*.

5. Analisis *Post Hoc*

   Bila pada uji *One–Way ANOVA* menghasilkan nilai p<0,05.

6. Uji *Mann–Whitney Test*

   Bila pada uji *Kruskal Wallis* menghasilkan nilai p<0,05 atau sebagai uji non–parametrik uji T tidak berpasangan.

I. Etika Penelitian

Implikasi etik pada hewan, pengelolaan binatang coba pada penelitian ini mengikuti *animal ethics*. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain megikuti prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu *replacement, reduction,* dan *refinement* (Ridwan, 2013). *Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh mahluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. Dalam hal ini, peneliti tetap menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Spargue Dawley* dan tidak digantikan dengan hewan coba lainnya. *Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini, peneliti menghitung jumlah minimum menggunakan rumus Frederer yaitu (n-1) (t-1)>15, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan. *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi (*humane*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Pada dasarnya prinsip *refinement* berarti membebaskan hewan coba dari beberapa kondisi. Yang pertama adalah bebas dari rasa lapar dan haus, dengan memberikan akses makanan dan air minum yang sesuai dengan jumlah yang memadai baik jumlah dan komposisi nutrisi untuk kesehatannya.