

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode acak terkontrol dengan pola *post test-only control group design*. Menggunakan 25 ekor tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur Sprague dawley berumur 5 minggu yang dipilih secara *random* yang dibagi menjadi 5 kelompok.

#### **B. Tempat dan Waktu**

Penelitian dilakukan di *animal house* FK Unila, sedangkan pembuatan preparat dan pengamatannya dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi FK Unila. Penelitian dilaksanakan selama lima bulan, yaitu Agustus sampai Desember.

### C. Populasi dan Sampel

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

Sebagai sampel penelitian digunakan 25 ekor tikus betina yang dipilih secara acak dan dibagi dalam 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali. Untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial, rumus penentuan sampelnya adalah:

$$(t-1)(r-1) > 15$$

Dimana  $t$  adalah jumlah kelompok percobaan dan  $r$  adalah jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok. Penelitian ini dibagi dalam 5 kelompok perlakuan sehingga perhitungan sampelnya:

$$(5-1)(r-1) > 15$$

$$4r - 4 > 15$$

$$4r > 19$$

$$r > 4,75$$

Jadi, dengan jumlah kelompok percobaan adalah 5 kelompok dan sampel yang digunakan dalam setiap kelompok percobaan adalah 5 ekor ( $n > 4,75$ ), penelitian ini memakai 25 ekor tikus putih betina.

Kriteria inklusi dan eksklusi:

1. Kriteria inklusi

- a. Sehat
- b. Memiliki berat badan 180-200 gram
- c. Jenis kelamin betina
- d. Berusia 5 minggu

2. Kriteria eksklusi

- a. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak dan aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus, genital).
- b. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.

**D. 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 120 mg/kgBB, 240 mg/kgBB, dan 480 mg/kgBB.

## 2. Bahan Kimia

Bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat histologis dengan metode paraffin meliputi: 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. Alat bedah minor untuk pembedahan tikus
- d. Kandang tikus
- e. Botol minuman tikus
- f. Mikroskop cahaya

## 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*, rak pewarnaan, kertas saring, *histoplast*, dan *paraffin dispenser*.

## E. Prosedur Penelitian

### 1. Metode Pembuatan Ekstrak Etanol 70% Buah Mahkota Dewa

Cara pembuatan ekstrak 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 lemari 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 °C 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).

$$\begin{aligned} \text{Dosis tikus (200g)} &= 120 \text{ mg/kgBB} / 1000 \\ &= 0,12 \text{ mg/gBB} \times 200 \\ &= 24 \text{ mg/200gBB} \end{aligned}$$

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 pengalihan 2x dosis pertama dan dosis ketiga diambil dari hasil pengalihan 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, diberikan DMBA dengan dosis 30mg/kgBB. Kelompok III adalah kelompok perlakuan coba dengan pemberian ekstrak mahkota dewa dosis 120 mg/kgBB/tikus, kelompok IV dengan dosis mahkota dewa sebanyak 240 mg/kgBB/tikus, dan kelompok V dengan dosis mahkota dewa sebanyak 480 mg/kgBB/tikus. Masing-masing mahkota dewa diberikan secara peroral selama 15 hari.
- b. Setelah 15 hari, perlakuan diberhentikan.
- c. Selanjutnya tikus dinarkose dengan eter dan dilakukan pembedahan untuk mengambil organ paru-paru.
- d. Dilakukan laparotomi, paru-paru tikus diambil untuk sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksilin Eosin.
- e. Sampel paru difiksasi dengan formalin 10%.
- f. Teknik pembuatan preparat:
  - 1) *Fixation*
    - a) Memfiksasi spesimen berupa potongan organ paru yang telah dipilih segera dengan larutan pengawet formalin 10%.
    - b) Mencuci dengan air mengalir.
  - 2) *Trimming*

- a) Mengecilkan organ  $\pm 3$  mm.
  - b) Memasukkan potongan organ paru tersebut ke dalam *embedding cassette*.
- 3) Dehidrasi
- a) Menuntaskan air dengan meletakkan *embedding cassette* pada kertas tisu.
  - b) Berturut-turut melakukan perendaman organ paru 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  $65,1^{\circ}\text{C}$ .
- 5) *Embedding*
- a) Menuangkan paraffin cair dalam pan.
  - b) Memindahkan satu persatu dari *embedding cassette* ke dasar pan.
  - c) Melepaskan paraffin yang berisi potongan paru dari pan dengan memasukkan ke dalam suhu  $4-6^{\circ}\text{C}$  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 yang 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 *xylol* 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.

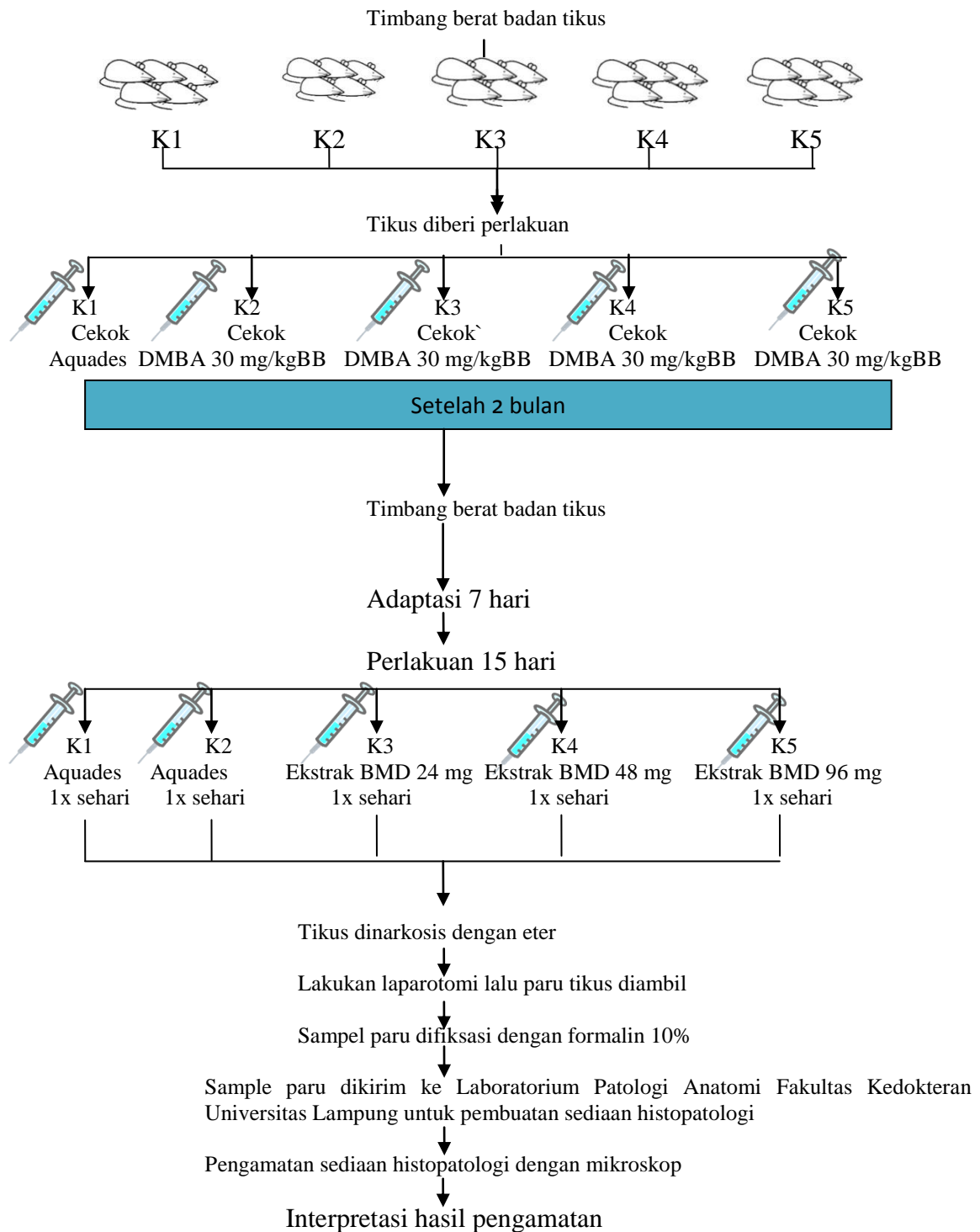
Kemudian memasukkan potongan organ dalam Eosin selama 2 menit. Secara berurutan memasukkan potongan organ dalam alkohol 96% selama 2 menit, Alkohol 96%, alkohol absolut III dan IV masing-masing selama 3 menit. Terakhir, memasukkan dalam *xylol* IV dan V masing-masing 5 menit.

7) *Mounting*

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

8) Membaca *slide* dengan mikroskop

*Slide* diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40x dengan 10 lapangan pandang.



**Gambar 7.** Diagram Alur Penelitian.

## **F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel**

### **1. Identifikasi Variabel**

Terdapat dua variabel dalam penelitian ini, yaitu:

#### a. Variabel *Independen*

- 1) perlakuan coba: pemberian ekstrak etanol 70% buah mahkota dewa.
- 2) perlakuan kontrol negatif : pemberian DMBA tanpa pemberian ekstrak etanol 70% buah mahkota dewa.
- 3) perlakuan kontrol normal : pemberian akuades

#### b. Variabel *Dependen*

Variabel *dependen* adalah gambaran histopatologi paru (kerusakan pada alveolus).

## 2. Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas, maka dibuat definisi operasional seperti yang terlihat pada Tabel 1:

**Tabel 1.** Definisi Operasional.

Variabel	Definisi	Skala
Dosis ekstrak etanol 70% buah mahkota dewa	Dosis efektif tengah ekstrak etanol 70% buah mahkota dewa adalah 24mg/200gBB. Kelompok I (kontrol negatif) = pemberian aquades Kelompok II (kontrol positif) = pemberian DMBA 30g/kgBB Kelompok III (perlakuan coba) = pemberian ekstrak etanol 70% buah mahkota dewa 24mg/200gBB + DMBA 30 mg/kgBB Kelompok IV (perlakuan coba) = pemberian ekstrak etanol 70% buah mahkota dewa 48mg/200gBB + DMBA 30 mg/kgBB Kelompok V (perlakuan coba) = pemberian ekstrak etanol 70% buah mahkota dewa 96mg/200gBB + DMBA 30 mg/kgBB.	Kategorik
Gambaran histopatologi paru-paru tikus	Gambaran histopatologi paru diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Kerusakan yang dinilai adalah jumlah infiltrasi sel radang. Skala kerusakan sel kemudian dihitung secara semikuantitatif dalam 5 lapang pandang berbeda. (Hansel & Barnes, 2004) 0= tidak ada perubahan struktur histologis 1= infiltrasi sel radang kurang dari sepertiga lapangan pandang 2=infiltrasi sel radang pada sepertiga hingga duapertiga lapangan pandang 3= infiltrasi sel radang lebih dari duapertiga lapangan pandang	Numerik

## G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histopatologi di bawah mikroskop diuji analisis statistik menggunakan *software* statistik. Hasil penelitian dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampai  $\leq 50$ . Jika varians data berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan metode uji parametrik *One-way anova*. Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, digunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*. Hipotesis dianggap bermakna bila  $p < 0,050$ . Jika pada uji *One-way anova* menghasilkan nilai  $p < 0,050$ , maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-Hoc* LSD atau jika pada uji *Kruskal-Wallis* bermakna dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

## H. Etika Penelitian

Implikasi etik pada hewan, pengelolaan binatang pada penelitian ini mengikuti *animal etics*. Ilmuwan penelitian kesehatan yang menggunakan model hewan menyepakati bahwa hewan coba yang menderita dan mati untuk kepentingan manusia perlu dijamin kesejahteraannya dan diperlakukan secara manusiawi. Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba,

penulis menerapkan protokol penelitian, yaitu: *replacement*, *reduction*, dan *refinement*.

*Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan pada penelitian ini dengan menggunakan tikus betina galur *Sprague dawley* sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.

*Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam hal ini peneliti memakai rumus frederer, dimana rumus ini untuk mencari jumlah minimum yang dihitung menggunakan rumus Frederer yaitu  $(t-1)(r-1) > 15$ , dimana  $t$  merupakan jumlah kelompok percobaan dan  $r$  merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok.

*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, dimana peneliti melakukan beberapa perlakuan pada hewan coba. Pertama, 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. Kedua, hewan percobaan bebas dari ketidaknyamanan, disajikan lingkungan yang bersih dan paling sesuai dengan biologi hewan percobaan yang dipilih, dengan perhatian terhadap: siklus cahaya, suhu, kelembaban lingkungan, dan fasilitas fisik seperti ukuran kandang untuk kebebasan bergerak, kebiasaan hewan untuk mengelompok atau menyendiri.