

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode acak terkontrol. Menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 10-16 minggu yang dipilih secara *random* yang dibagi menjadi 5 kelompok.

B. Tempat dan Waktu

Pemeliharaan dilakukan di *pet house* sedangkan pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Unila. Penelitian dilaksanakan selama 10 hari di bulan November 2012.

C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *Sprague dawley* berumur 10-16 minggu yang diperoleh dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor.

Sampel penelitian yang digunakan sebanyak 25 ekor tikus yang dipilih secara acak dan dibagi dalam 5 kelompok dengan pengulangan sebanyak 5 kali. Menurut Frederer (1967) rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah:

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

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:

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

$$5n - 5 > 15$$

$$5n > 20$$

$$n > 4$$

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

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria inklusi

- a. Sehat
- b. Memiliki berat badan antara 100 - 150 gram
- c. Jenis kelamin jantan
- d. Berusia sekitar \pm 10-16 minggu (dewasa)

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.

E. Alat dan Bahan

1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan ada dua yaitu rifampisin dengan dosis 1 g/kgBB dan ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarfa*) dengan dosis 7,56 mg/100gBB, 15,12 mg/100gBB, dan 30,24 mg/100gBB.

2. Bahan Kimia

Larutan kloroform sebagai pembius sebelum tikus di bedah.

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. S spuit oral 1 cc, 3 cc dan 5 cc
- c. Minor set untuk pembedahan tikus
- d. Gelas ukur untuk mengukur volume hepar
- e. Kapas
- f. Botol minuman tikus

- g. Kamera digital

F. Prosedur Penelitian

1. Prosedur Pemberian Ekstrak Buah Mahkota Dewa

- a. Cara pembuatan ekstrak buah mahkota dewa :

Proses pembuatan ekstrak buah mahkota dewa dalam penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut. Penelitian ini menggunakan pelarut etanol untuk membedakan dengan penelitian sebelumnya oleh Singh *et al.* (2009), yang menggunakan pelarut air.

Menurut Sulistianto *et al.* (2004) 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 °C sehingga akhirnya diperoleh ekstrak kering.

- b. Cara perhitungan dosis ekstrak buah mahkota dewa

Dosis normal pada manusia adalah 12 mg/kgBB (Rahmawati, 2006). Angka konversi dari manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 g adalah 0,018.

$\begin{aligned} \text{Dosis tikus (200 g)} &= 12 \text{ mg/kgBB} \times 70 \text{ kg} \times 0,018 \\ &= 840\text{mg} \times 0,018 = 15,12\text{mg}/200\text{gBB} \end{aligned}$

Dosis untuk 100 g tikus adalah 7,56 mg/100mgBB. Dalam penelitian ini kelompok kontrol normal dan kontrol positif tidak diberikan ekstrak buah mahkota dewa. Dosis buah mahkota dewa pertama diambil dari dosis normal tikus, sedangkan dosis mahkota dewa kedua diambil dari hasil pengalihan 2x dari dosis pertama. Sedangkan untuk dosis ketiga diambil dari hasil pengalihan 4x dosis normal atau 2x dari hasil pengalihan dosis kedua. Hal ini memicu pada penelitian yang dilakukan oleh Nurul, Tetri, dan Shanti (2006) bahwa penggunaan dosis 0,033 g ekstrak mahkota dewa mampu menyebabkan efek teratogenik pada tikus bunting selama 10 hari di hari ke-7 hingga 17 pada saat kehamilan.

Untuk kelompok perlakuan I : 7,56 mg/100gBB

Untuk kelompok perlakuan II : 2 x 7,56 mg/100gBB
= 15,12 mg/100gBB

Untuk kelompok perlakuan III : 4 x 7,56 mg/100gBB
= 30,24 mg/100gBB

Volume ekstrak buah mahkota dewa diberikan secara oral sebanyak 1 ml yang merupakan volume yang boleh diberikan didasarkan pada volume normal lambung tikus 3-5 ml. Jika volume ekstrak melebihi volume lambung dapat berakibat dilatasi lambung secara akut yang dapat menyebabkan robeknya saluran cerna (Ngatidjan, 2006).

2. Prosedur Pemberian Dosis Rifampisin

Dosis rifampisin yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan dari hasil penelitian sebelumnya diberikan rifampisin 1 g/kgBB per hari. Dosis ini merupakan dosis toksik pada tikus. Pada penelitian sebelumnya didapatkan hasil bahwa dosis tersebut dapat menyebabkan trombositopenia, anemia hemolitik, *transient leucopenia*, dan peningkatan *nucleated cell* pada sumsum tulang belakang serta penurunan berat kelenjar timus secara signifikan pada tikus. Selain itu juga rifampisin dengan dosis 1 g/kgBB per hari akan menginduksi peningkatan enzim sitokrom P-450, lipid peroksidasi, mutasi superoxide di hati, dan sumsum tulang belakang (Dhuley *and* Naik, 1998).

Hal ini berarti sebagai berikut :

Pada berat tikus rata-rata sekitar 100 mg atau 0,1 kg maka dosis perekor tikus sebesar : $1 \text{ g/kgBB} \times 0,1 \text{ kg} = 0,1 \text{ g} = 100 \text{ mg}$

Dosis rifampisin yang dipilih adalah rifampisin tablet sediaan 600 mg, hal ini dikarenakan pemberian peroral. Rifampisin tablet digerus dan

dilarutkan dalam 6 ml *aquadest*. Jadi dalam 1 ml larutan rifampisin terdapat 100 mg.

3. Prosedur Penelitian

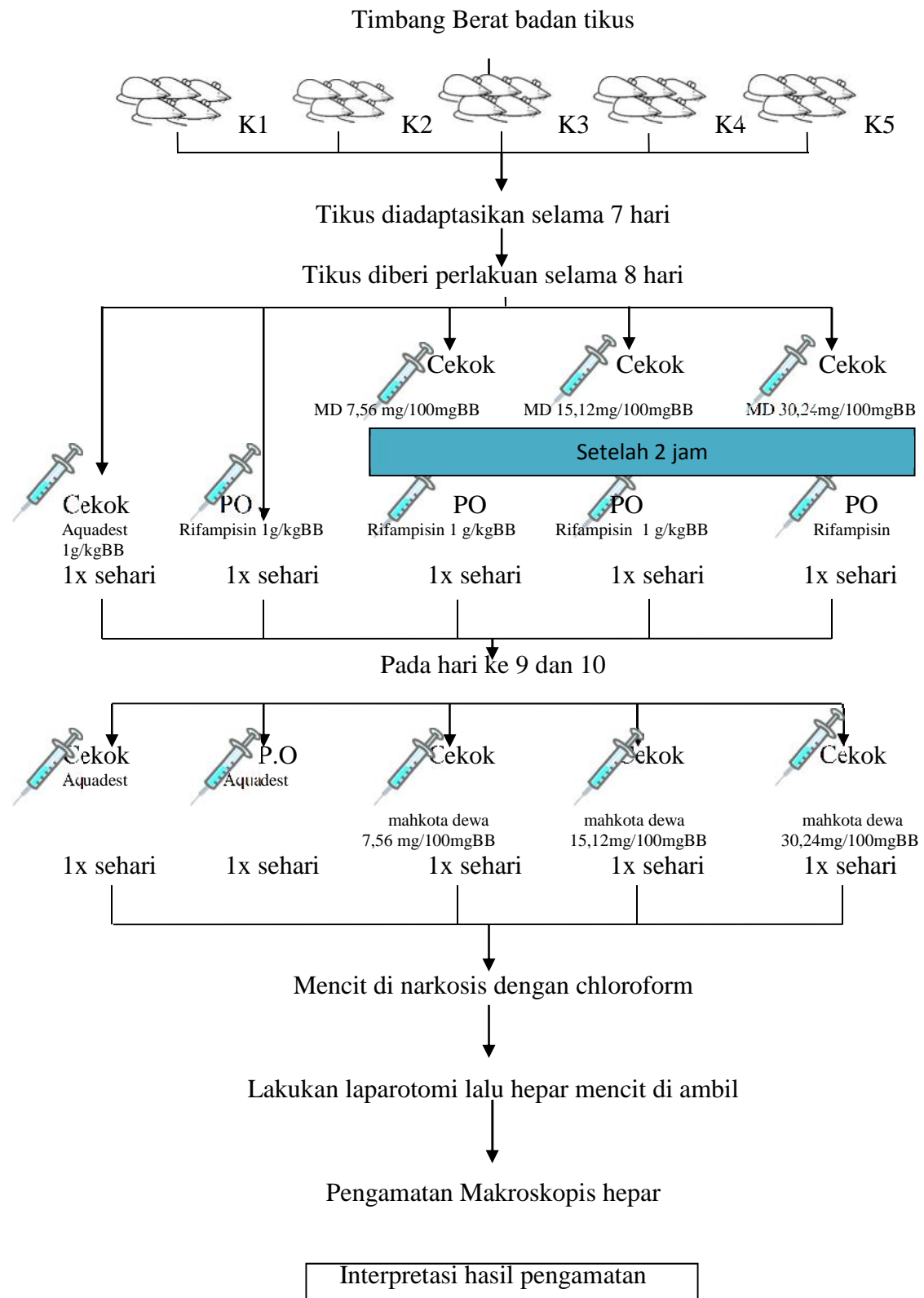
- a. Tikus sebanyak 25 ekor dikelompokkan dalam 5 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol normal hanya yang diberi *aquadest*. Kelompok II sebagai kontrol positif diberikan rifampisin dengan dosis 1 g/kgBB. Kelompok III adalah kelompok perlakuan coba dengan pemberian ekstrak mahkota dewa dosis 7,56 mg/100gBB, kelompok IV dengan dosis mahkota dewa sebanyak 15,12 mg/100gBB, dan kelompok V dengan dosis mahkota dewa sebanyak 30,24mg/100gBB. Kemudian selang 2 jam kelompok III, IV, dan V diberikan induksi rifampisin sebesar 1 g/kgBB. Masing-masing diberikan secara peroral selama 8 hari. Kemudian pada hari ke 9 dan 10 masing-masing tikus dari kelompok III, IV, dan V tetap diberikan ekstrak mahkota dewa.
- b. Setelah 10 hari perlakuan diberhentikan.
- c. Selanjutnya tikus dinarkose dengan kloroform dan dilakukan pembedahan.
- d. Dilakukan laparotomi, hepar diambil.
- e. Pemeriksaan makroskopis hepar.
 - 1) Mengamati gambaran morfologi makroskopis hepar dan sasaran yang diamati adalah permukaan luar hepar serta bentuk. Pengamatan dilakukan oleh peneliti sendiri. Penilaian morfologi makroskopis hepar berdasarkan buku *Robins and Cotran*

pathologic basis of disease yang dibuat kriteria skoring sendiri, sebagai berikut:

Tabel 1. Skor penilaian morfologi makroskopis hepar

Luas daerah	Skor
Normal	0
Abnormal < 25%	1
Abnormal 26%-50%	2
Abnormal 50%-75%	3
Abnormal 76%-100%	4

- 2) Mengukur volume hepar dengan cara memasukkan organ ke dalam gelas ukur yang telah diisi *aquadest*. Volume hepar yang diukur adalah kenaikan permukaan *aquadest* pada gelas ukur.
- 3) Menimbang berat hepar tikus dengan Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g.



Gambar 11. Diagram alur penelitian

G. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

a. Variabel Independen

- 1) Perlakuan coba: pemberian ekstrak buahmahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dan rifampisin.
- 2) perlakuan kontrol positif: pemberian rifampisin tanpa pemberian ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*).
- 3) perlakuan kontrol normal: pemberian *aquadest*.

b. Variabel Dependen

Variabel dependen adalah gambaran makroskopis hepar (morfologi, berat, dan volume).

2. Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas, maka dibuat definisi operasional sebagai berikut:

Tabel 2. Definisi operasional

Variabel	Definisi	Skala
Dosis ekstrak buah mahkota dewa	<p>Dosis efektif tengah mahkota dewa adalah 15,12 mg/150gBB.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kelompok I (kontrol normal) = pemberian <i>aquadest</i> - Kelompok II (kontrol positif) = pemberian rifampisin 1 g/kgBB - Kelompok III (perlakuan coba) = pemberian mahkota dewa 7,56 mg/100gBB + rifampisin 1 g/kgBB - Kelompok IV (perlakuan coba) = pemberian mahkota dewa 15,12 mg/100gBB + rifampisin 1 g/kgBB - Kelompok V (perlakuan coba) = pemberian mahkota dewa 30,24 mg/100gBB + rifampisin 1 g/kg BB 	Numerik
Gambaran makroskopis hepar	<p>Sediaan makroskopis diamati secara langsung :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Morfologi dilihat kelainan permukaan dan bentuk hepar • berat diukur dengan Neraca analitik <i>Metler Toledo</i> dengan tingkat ketelitian 0,01 g • volume diukur dengan gelas ukur dengan dilihat kenaikan volum air ketelitian 0,5 ml 	Numerik

H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan histopatologi dianalisis menggunakan program SPSS versi 17.0. Hasil penelitian dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas Shapiro-Wilk karena jumlah sampel 50. Kemudian, dilakukan uji Levene untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data memiliki varians yang sama atau tidak. 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 $p < 0,05$. Jika pada uji Anova atau Kruskal-Wallis menghasilkan nilai $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-Hoc least significant difference* (LSD) untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.