

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test-only control group design*. Sebanyak 50 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 10-16 minggu yang dipilih secara acak dan dibagi menjadi 10 kelompok, dengan pengulangan sebanyak 5 kali.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK Unila untuk mengetahui gambaran mikroskopis hepar. Waktu penelitian selama bulan November.

C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 10-16 minggu yang diperoleh dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor. Sampel penelitian sebanyak 25 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok. Menurut Dahlan (2009), pada uji eksperimental ini, variabel yang diuji adalah numerik tidak berpasangan sehingga perhitungan sampel dihitung dengan rumus:

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(z\alpha + Z\beta) S}{x_1 - x_2} \right]^2$$

Dengan nilai $Z\alpha = 1,96$; $Z\beta = 0,84$; simpangan baku = S dan perbedaan rerata gambaran mikroskopis hepar diharapkan sebagai $(x_1 - x_2)$. Pada penelitian sebelumnya oleh Amalia (2008), yaitu membandingkan kadar *Serum Glutamic Piruvic Transaminase* (SGPT) yang diinduksi parasetamol, dengan memasukkan data masing-masing peningkatan pada indikator tersebut kedalam rumus maka akan diperoleh jumlah sampel yang digunakan sebagai berikut:

$$S = 0,2028$$

$x_1 - x_2 = 0,355$, maka akan didapatkan perhitungan sebagai berikut:

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(z\alpha + Z\beta) S}{x_1 - x_2} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(1,96 + 0,84) 0,2028}{0,355} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{0,56784}{0,355} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = 2[1,5]^2$$

$$n_1 = n_2 = 4,5$$

Maka jumlah minimal sampel perkelompok dibulatkan adalah 5 ekor tikus per kelompok.

Jadi sampel yang akan digunakan adalah berdasarkan perhitungan, yaitu sejumlah 5 ekor tikus pada masing-masing kelompok percobaan dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 5 kelompok, sehingga untuk satu tanaman herba menggunakan 25 ekor tikus putih. Dikarenakan penelitian menggunakan dua tanaman herba yaitu mahkota dewa dan ceplukan, maka jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 50 ekor tikus putih dan jumlah kelompok yang digunakan adalah 10 kelompok.

Kriteria inklusi:

1. Sehat (tidak tampak penampakan rambut kusam, rontok, atau botak, dan bergerak aktif);
2. Memiliki berat badan sekitar 100-150 gram;
3. Berjenis kelamin jantan;
4. Berusia sekitar \pm 10-16 minggu (dewasa).

Kriteria eksklusi:

1. 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.

D. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan ada tiga yaitu rifampisin dengan dosis 1 g/kgBB, kemudian ekstrak mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dan ekstrak ceplukan (*Physalis angulata L.*) dengan dosis 7,56 mg/100gBB, 15,12 mg/100gBB dan 30,24 mg/100gBB.

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 (FK Unila, 2011).

3. Alat Penelitian

a. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- 1) Neraca analitik *Metler Toledo* dengan tingkat ketelitian 0,01 g, untuk menimbang berat tikus;
- 2) Sduit oral 1 cc, 3 cc dan 5 cc;
- 3) Minor set, membedah tikus untuk mengidentifikasi hepar;
- 4) Kapas dan alkohol.

b. Alat pemeriksaan mikroskopis: Mikroskop, objek glass, cairan emersi;

c. Kamera digital.

E. Prosedur Penelitian

1. Prosedur Pemberian Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dan Ekstrak Daun Ceplukan (*Physalis angulata L.*).

a. Cara pembuatan ekstrak:

Proses pembuatan ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dan ekstrak daun ceplukan (*Physalis angulata L.*) dalam penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut. Penelitian ini menggunakan pelarut etanol, untuk membedakan dengan penelitian sebelumnya oleh Singh dkk., (2009) yang menggunakan pelarut air.

Menurut Sulistianto dkk., (2004), ekstraksi dimulai dari penimbangan buah mahkota dewa dan daun ceplukan. Selanjutnya masing-masing 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 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/100gBB. Berhubung penelitian ini ingin mengetahui sekaligus membandingkan efektifitas antara ekstrak buah mahkota dewa dengan ekstrak daun ceplukan, maka dosis ekstrak daun ceplukan

menggunakan dosis yang sama dengan dosis ekstrak buah mahkota dewa. Dalam penelitian ini kelompok kontrol negatif dan kontrol positif tidak diberikan ekstrak mahkota dewa dan ceplukan. Dosis pertama mahkota dewa dan ceplukan 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 pertama atau 2x dari dosis kedua.

1) Dosis untuk tiap tikus kelompok III

$$7,56 \text{ mg}/100\text{gBB}$$

2) Dosis untuk tiap tikus kelompok IV

$$2 \times 7,56 \text{ mg}/100\text{gBB} = 15,12 \text{ mg}/100\text{gBB}$$

3) Dosis untuk tiap tikus kelompok V

$$4 \times 7,56 \text{ mg}/100\text{gBB} = 30,24 \text{ mg}/100\text{gBB}$$

Volume ekstrak buah mahkota dewa dan daun ceplukan 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).

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 dimana dengan dosis 1 g/kgBB per hari sudah dapat menginduksi peningkatan enzim sitokrom P450, peroksidasi lipid, aktivitas *superoxide dismutase* (SOD) di hati dan sumsum tulang belakang (Dhuley dan Naik, 1998).

Hal ini berarti sebagai berikut:

Pada berat tikus rata-rata sekitar 100 mg atau 0,10 kg maka dosis per ekor tikus sebesar:

$$1 \text{ g/kgBB} \times 0,10 \text{ kg} = 0,10 \text{ g} = 100 \text{ mg.}$$

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) Untuk setiap tanaman herba, tikus sebanyak 25 ekor, dikelompokkan dalam 5 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol normal, hanya yang diberi aquades. Kelompok II sebagai kontrol patologis, diberikan rifampisin dengan dosis 1

g/kgBB. Kelompok III adalah kelompok perlakuan coba dengan pemberian dosis mahkota dewa/ceplukan dengan dosis 7,56 mg/100gBB, kelompok IV dengan dosis mahkota dewa/ceplukan sebanyak 15,12 mg/100gBB, dan kelompok V dengan dosis mahkota dewa/ceplukan sebanyak 30,24 mg/kgBB. 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/ceplukan;

- b) Setelah 10 hari, perlakuan diberhentikan;
- c) Selanjutnya tikus dibius dengan kloroform dan dilakukan pembedahan;
- d) Dilakukan pemeriksaan morfologi hepar secara mikroskopis:

Organ hepar dibuat preparat histopatologi dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin. Kemudian preparat histopatologi dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi untuk dikonsultasikan dengan ahli patologi anatomi. Pengamatan mikroskopis dilakukan oleh peneliti sendiri.

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 degenerasi bengkak keruh yang terjadi pada hepatosit. Skala degenerasi bengkak keruh kemudian dihitung secara semikuantitatif dalam 5 lapang pandang berbeda.

Berikut ini adalah skala penilaian Kawasaki (2009) dengan modifikasi:

Tabel 2. Skor penilaian derajat histopatologi sel hepar

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

Metode teknik pembuatan preparat histopatologi menurut bagian PA FK Unila (2011):

1) *Fixation*

- a. Spesimen berupa potongan organ hepar yang telah dipotong secara representatif kemudian segera difiksasi dengan formalin 10% selama 3 jam.
- b. Dicuci dengan air mengalir sebanyak 3-5 kali.

2) *Trimming*

- a. Organ dicecilkan hingga ukuran ± 3 mm.
- b. Potongan organ hepar tersebut lalu dimasukkan ke dalam *tissue cassette*.

3) Dehidrasi

- a. Mengeringkan air dengan meletakkan *tissue cassette* pada kertas tisu.
- b. Berturut-turut organ hepar direndam dalam alkohol 70% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam, alkohol absolut selama 1 jam, dan alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam.

4) *Clearing*

Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan *clearing* dengan xylol I dan II, masing-masing selama 1 jam.

5) Impregnasi

Impregnasi dilakukan dengan menggunakan paraffin selama 1 jam dalam oven suhu 65⁰ C.

6) *Embedding*

- a) Sisa paraffin yang ada pada pan dibersihkan dengan memanaskan beberapa saat di atas api dan diusap dengan kapas.
- b) Paraffin cair disiapkan dengan memasukkan paraffin ke dalam cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu di atas 58⁰C.
- c) Paraffin cair dituangkan ke dalam pan.
- d) Dipindahkan satu per satu dari *tissue cassette* ke dasar pan dengan mengatur jarak yang satu dengan yang lainnya.
- e) Pan dimasukkan ke dalam air.
- f) Paraffin yang berisi potongan hepar dilepaskan dari pan dengan dimasukkan ke dalam suhu 4-6⁰ C beberapa saat.

- g) Paraffin dipotong sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan skalpel/pisau hangat.
- h) Lalu diletakkan pada balok kayu, diratakan pinggirnya, dan dibuat ujungnya sedikit meruncing.
- i) Memblok paraffin, siap dipotong dengan mikrotom.

7) *Cutting*

- a) Pemotongan dilakukan pada ruangan dingin.
- b) Sebelum memotong, blok didinginkan terlebih dahulu di lemari es.
- c) Dilakukan pemotongan kasar, lalu dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron. Pemotongan dilakukan menggunakan *rotary microtome* dengan *disposable knife*.
- d) Dipilih lembaran potongan yang paling baik, diapungkan pada air, dan dihilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
- e) Lembaran jaringan dipindahkan ke dalam *water bath* suhu 60⁰ C selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
- f) Dengan gerakan menyendok, lembaran jaringan tersebut diambil dengan *slide* bersih dan ditempatkan di tengah atau pada sepertiga atas atau bawah.
- g) *Slide* yang berisi jaringan ditempatkan pada inkubator (suhu 37⁰C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.

8) *Staining* (pewarnaan) dengan Harris Hematoksilin-Eosin

Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, dipilih *slide* yang terbaik, selanjutnya dilakukan deparafinisasi dalam larutan xylol I selama 5 menit dan larutan xylol II selama 5 menit. Kemudian, dihidrasi dalam ethanol absolut selama 1 jam, alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 70% selama 2 menit, dan air selama 10 menit. Lalu dilakukan pulasan inti dengan Harris Hematoksilin selama 15 menit, dibilas dengan air mengalir, lalu diwarnai dengan eosin selama maksimal 1 menit. Selanjutnya, didehidrasi dengan alkohol 70% selama 2 menit, alkohol 96% selama 2 menit, dan alkohol absolut selama 2 menit. Kemudian dilakukan penjernihan dengan xylol I selama 2 menit dan xylol II selama 2 menit.

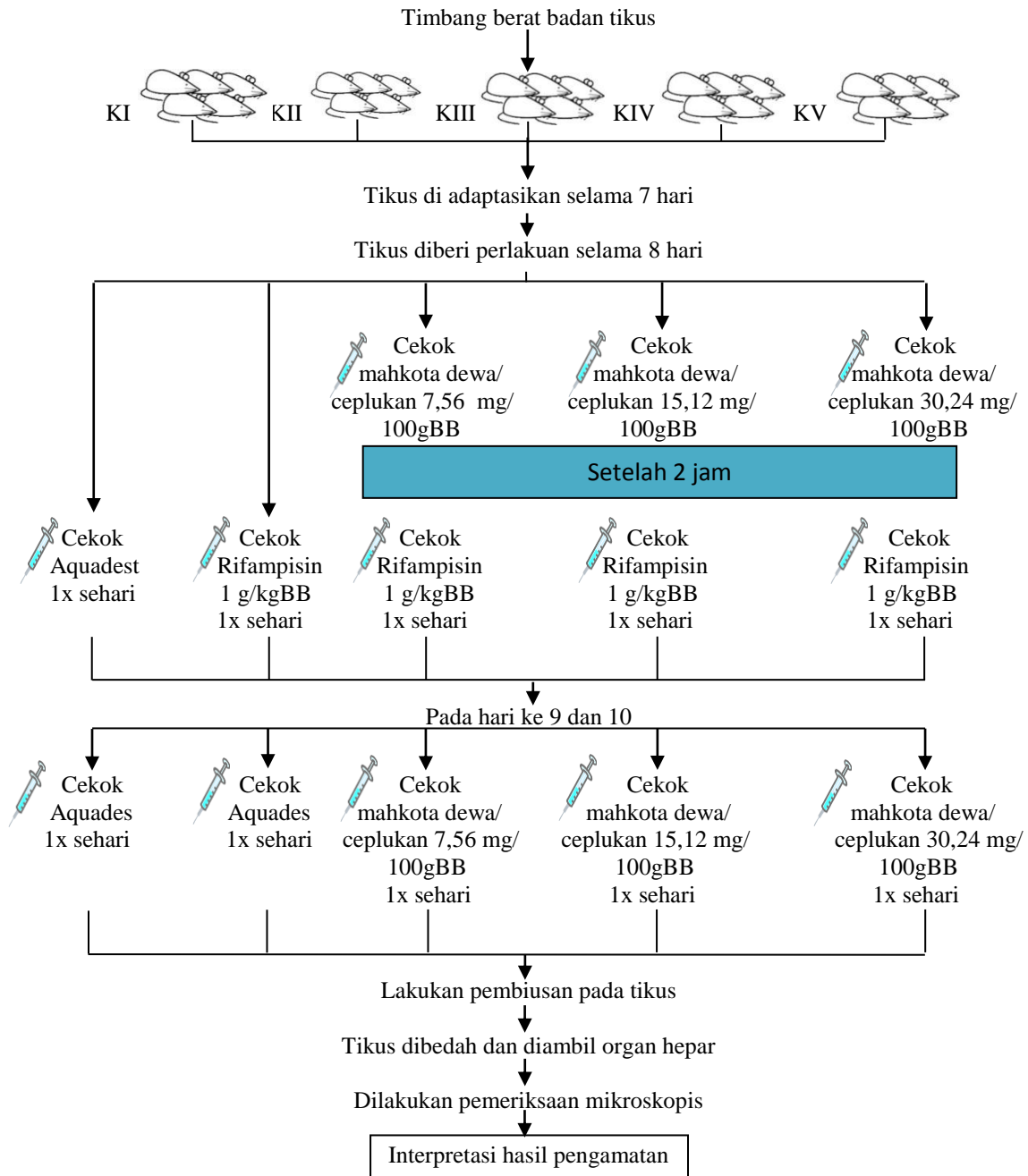
9) *Mounting* dengan entelan dan tutup dengan *deck glass*

Setelah pewarnaan selesai, *slide* ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, ditetesi dengan bahan *mounting*, yaitu entelan, dan ditutup dengan *deck glass*, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

10) *Slide* dibaca dengan mikroskop

Slide diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Preparat histopatologi dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi untuk dikonsultasikan dengan ahli patologi anatomi. Pengamatan mikroskopis dilakukan oleh peneliti sendiri.

Sel-sel bervakuola merupakan salah satu karakteristik kerusakan sel yang mengalami hepatotoksik. Sel-sel yang mengalami hepatotoksik memiliki kandungan glikogen atau lemak yang meningkat pada vakuola sehingga dapat membesar dan tampak di bawah mikroskop cahaya.



Gambar 12. Diagram alur penelitian

F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

- a. Variabel Independen adalah pemberian ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dan daun ceplukan (*Physalis angulata L.*);
- b. Variabel dependen adalah gambaran mikroskopis hepar.

2. Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. Definisi operasional variabel

Variabel	Definisi	Skala
Dosis ekstrak buah mahkota dewa dan ekstrak daun ceplukan	Dosis efektif mahkota dewa dan ceplukan adalah 7,65 mg/100gBB <ul style="list-style-type: none"> • Kelompok I (kontrol negatif) = pemberian aquadest • Kelompok II (kontrol positif) = pemberian rifampisin 1 g/kgBB • Kelompok III (perlakuan coba) = pemberian mahkota dewa/ceplukan dosis 7,56 mg/100gBB + rifampisin 1 g/kgBB • Kelompok IV (perlakuan coba) = pemberian mahkota dewa/ceplukan dosis 15,12 mg/100gBB + rifampisin 1 g/kgBB • Kelompok V (perlakuan coba) = pemberian mahkota dewa/ceplukan dosis 30,24 mg/100gBB + rifampisin 1 g/kgBB 	Numerik
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 berupa degenerasi bengkak keruh yang terjadi pada hepatosit. Skala degenerasi bengkak keruh kemudian dihitung secara semikuantitatif dalam 5 lapang pandang berbeda. Skala penilaian Kawasaki (2009) dengan modifikasi: <ul style="list-style-type: none"> • 0 = tidak ada hepatosit yang mengalami degenerasi bengkak keruh; • 1 = <10% hepatosit yang mengalami degenerasi bengkak keruh; • 2 = 10% – 33% hepatosit yang mengalami degenerasi bengkak keruh; • 3 = 34% – 66% hepatosit yang mengalami degenerasi bengkak keruh; • 4 = >66% – 100% hepatosit yang mengalami degenerasi bengkak keruh. 	Numerik

G. Analisis Data

Analisis data penelitian diproses dengan program SPSS versi 17.0 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.

7. Uji T tidak berpasangan

Untuk menguji perbedaan pengaruh antara kelompok tikus yang diberikan ekstrak daun ceplukan dengan kelompok tikus yang diberikan ekstrak buah mahkota dewa.