

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat ekperimental laboratorium dengan rancangan *posttest only with control group design*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini rencananya dilakukan di laboratorium patologi anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta pada bulan November 2018. Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur Swiss webster berusia 2-3 bulan dengan berat badan \pm 20-30 gr.

C. Populasi

1. Populasi target

Populasi target dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus L*)

2. Populasi aktual

Populasi aktual dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus L*) yang dipapar asap rokok

D. Sampel dan Tehnik Sampling

Pada penelitian ini, sampel yang akan menjadi fokus penelitian adalah mencit yang diberi paparan asap rokok. Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *purposive sampling* yaitu dengan cara memilih mencit jantan (*Mus musculus L*) yang sehat, memiliki berat antara \pm 20 – 30 gram, dan berumur 2-3 bulan.

E. Estimasi Besar Sampel

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi 6 kelompok. Sampel diambil dari populasi tersebut dan besarnya ditentukan berdasarkan rumus Federer sebagai berikut:

Rumus federer:

$$(n-1) \times (t-1) \geq 15$$

Keterangan

: n = Jumlah sampel tiap kelompok

: t = Jumlah Kelompok

Banyak Kelompok

: 5 Kelompok (t =)

Sampel tiap Kelompok

: $(n-1) \times (t-1) \geq 15$

$$(n-1) \times (5-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times 4 \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq (15 + 4) / 4$$

$$n \geq 4,75 \text{ (dibulatkan)}$$

$$n \geq 5$$

Penghitungan dengan menggunakan rumus federer didapatkan jumlah mencit 5 ekor perkelompok. Jumlah sampel yang digunakan penulis minimal 5 ekor mencit per kelompok. Selama penelitian kemungkinan mencit mengalami kematian dan sakit cukup besar sehingga jumlah sampel ditambah satu ekor. Penulis menggunakan 6 mencit per kelompok, sehingga jumlah keseluruhan mencit dalam penelitian ini adalah 30 ekormencit. Pengelompokan dilakukan secara acak atau random pada 5 kelompok uji.

F. Kriteria Restriksi

1. Kriteria Inklusi

- a. Berumur 2-3 bulan.
- b. Mencit jantan.
- c. Berat badan $\pm 20 - 30$ gram.
- d. Sehat dan mempunyai aktifitas normal.

2. Kriteria Eksklusi
 - a. Mencit jantan stres.
 - b. Mencit jantan mati.
 - c. Mencit jantan sakit.

G. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Pemberian ekstrak etanol buah delima dengan berbagai dosis perlakuan.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kerusakan sel hepar mencit yang sebelumnya sudah diberi paparan asap rokok.

3. Variabel Luar

a. Variabel terkendali

Jenis kelamin, umur, suhu udara, berat badan, dan jenis makanan mencit semua disamakan.

b. Variabel tidak terkendali

Kondisi psikologis hewan uji (*stress*), reaksi hipersensitivitas, imunitas hewan percobaan, abnormalitas spermatogenesis.

H. Definisi Operasional

1. Ekstrak Etanol Buah Delima

Ekstrak etanol buah delima didapatkan dengan metode maserasi menggunakan cairan pengekstrak etanol 96%. Delima merah didapatkan dari desa Gunungan, kabupaten Sukoharjo, provinsi Jawa Tengah. Delima yang didapat kemudian dipisahkan antara kulit dan buahnya, kemudian diblender dan diekstraksi menggunakan etanol 96%. Pemberian ekstrak etanol buah delima diberikan selama 35 hari dan dibagi menjadi 3 dosis pemberian yaitu

dengan volume pemberian 1 ml dengan konsentrasi ekstrak delima 350 mg/KgBB, 700 mg/KgBB, dan 1400 mg/KgBB(Widjaya, 2012).

Alat ukur :timbangan

Skala : rasio

Perhitungan dosis:

Dosis acuan untuk tikus adalah 100 mg / 200grtikus(Mansour *et al.*, 2013). Faktor konversi dari tikus ke mencit adalah 0,14. Maka dosis untuk mencit adalah:

$$\text{dosis uji} = \frac{\text{dosis acuan} \times \text{faktor konversi}}{\text{BB mencit}}$$

$$\text{dosis uji} = \frac{100 \times 0,14}{0,02}$$

$$\text{dosis uji} = 700 \text{ mg/KgBB}$$

Perhitungan konsentrasi

a. Dosis Perlakuan 1(350 mg/KgBB)

$$1\text{ml} = \frac{350 \times 0,02}{\text{konsentrasi}}$$

$$\text{konsentrasi} = 7 \text{ mg/mL}$$

Karena menggunakan 6 ekor mencit pada perlakuan 1, maka sediaan dibuat 5ml dengan ekstrak yang ditimbang sebagai berikut

:

$$\text{Ekstrak} = \text{konsentrasi} \times \text{volume}$$

$$\text{Ekstrak} = 7 \times 6$$

$$\text{Ekstrak} = 42 \text{ mg/ml}$$

- b. Dosis Perlakuan 2 (700 mg/KgBB)

$$1\text{ml} = \frac{700 \times 0,02}{\text{konsentrasi}}$$

$$\text{konsentrasi} = 14 \text{ mg/mL}$$

Karena menggunakan 6 ekor mencit pada perlakuan 2, maka sediaan dibuat 5ml dengan ekstrak yang ditimbang sebagai berikut:

$$\text{Ekstrak} = \text{konsentrasi} \times \text{volume}$$

$$\text{Ekstrak} = 14 \times 6$$

$$\text{Ekstrak} = 84 \text{ mg/ml}$$

- c. Dosis Perlakuan 3 (1400 mg/KgBB)

$$1\text{ml} = \frac{1400 \times 0,02}{\text{konsentrasi}}$$

$$\text{konsentrasi} = 28 \text{ mg/ml}$$

Karena menggunakan 6 ekor mencit pada perlakuan 3, maka sediaan dibuat 5ml dengan ekstrak yang ditimbang sebagai berikut:

$$\text{Ekstrak} = \text{konsentrasi} \times \text{volume}$$

$$\text{Ekstrak} = 28 \times 6$$

$$\text{Ekstrak} = 168 \text{ mg/ml}$$

2. Kerusakan Struktur Morfologi Sel Hepar

Struktur morfologi sel hepar normal pada potongan melintang akan terlihat sebagai struktur yang berderet dan radier, dengan pusatnya vena centralis, dipisahkan oleh sebuah celah atau sinusoid hepar, dan di temukan sel kupffer dan sel hepatosit (Mescher, 2012). Untuk melihat adanya perubahan struktur hati dan derajat kerusakan pada hati dilakukan pemeriksaan biopsi hati. Bila terjadi kerusakan hepar maka terdapat beberapa kelainan yang akan terlihat seperti nekrosis pada sel, terjadinya ballooning, dan lain-lain. Untuk melakukan penilaian kerusakan hepar menggunakan CRN scoring system (Onyekwere, 2015). Pengamatan meliputi ukuran makroskopis dan kerusakan struktur morfologi sel hepar yang dilakukan oleh seorang dokter ahli patologi anatomi di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

- a. Ukuran makroskopis hepar
Alat ukur : penggaris (cm³)
Skala : numeric
- b. Derajat kerusakan sel hepar
Alat ukur : CRN scoring system
Skala : numeric

Penilaian Histolgi	Grade	Found
Lobular Inflammation	0	None
	1	<2 foci/200x field
	2	2-4 foci/200x field
	3	>4 foci/200x field
Balloning	0	None
	1	Few ballon cells
	2	Many cells/prominent

I. Alat dan Bahan

1. Pembuatan ekstrak

- a. Alat : blender, kain hitam, gelas ukur , alat maserasi, dan pengaduk
- b. Bahan : buah delima merah, etanol 96%

2. Perlakuan

- a. Alat: timbangan duduk dan timbangan neraca, kandang hewan percobaan, spuit injeksi
- b. Bahan : aquadest, rokok kretek, makanan hewan percobaan (pelet)

3. Pengambilan data

- a. Alat: alat bedah hewan percobaan (skalpel, pinset, gunting, jarum, dan meja lilin), mikroskop cahaya medan terang, Alat untuk pembuatan preparat histology, alat hitung.
- b. Bahan : hematoxilin eosin Y, NaCl 0,9 %

J. Cara Kerja

1. Ekstraksi etanol delima

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Langkah pertama dalam ekstraksi etanol buah delima adalah buah delima dicuci bersih dan ditimbang sebanyak 3000 gram, kemudian memisahkan antara kulit dan buahnya. Selanjutnya, buah delima beserta bijinya dikeringkan dibawah sinar matahari secara tak langsung. Setelah kering kemudian diblender hingga halus kemudian dilarutkan dalam etanol 96% dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer. Labu erlenmeyer yang telah berisi ekstrak buah delima dibungkus dengan plastik gelap lalu diinkubasi di atas shaker selama 7 hari. Setelah diinkubasi selama 7 hari, labu erlenmeyer berisi ekstrak buah delima dimasukkan ke dalam microwave selama 30 menit pada suhu 50°C. Ekstrak etanol buah delima kemudian disaring dan diletakkan di atas cawan uap yang dipanaskan pada suhu sekitar 40°C (Widjaya, 2012).

2. Perlakuan hewan uji

a. Persiapan

- 1) Kandang tikus disiapkan dengan alas triplek. Mencit jantan sebanyak 30 ekor diadaptasikan dengan lingkungan kandang diberi makan standar.
- 2) Subjek penelitian dibagi menjadi 5 kelompok dengan randomisasi. Masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor mencit jantan (*Mus musculus L*). Kelompok penelitian terdiri dari kelompok kontrol normal, kelompok kontrol negatif, kelompok yang diberi ekstrak etanol delima dengan dosis 350mg/KgBB, kelompok yang diberi ekstrak etanol buah delima dengan dosis 700mg/KgBB, dan kelompok yang diberi ekstrak etanol buah delima dengan dosis 1400mg/KgBB.
- 3) Pembuatan ekstrak etanol buah delima dilakukan di FK UMS. Buah delima diekstraksi dengan etanol 96%. Hasil ekstraksi kemudian disimpan didalam almari pendingin.
- 4) Pemaparan asap rokok dilakukan 1x sehari pada pukul 15. 00 WIB dengan dosis 1 batang rokok untuk tiap kelompok perlakuan dan kelompok kontrol negatif.

b. Perlakuan

Tabel 2. Kelompok Perlakuan

No	Kelompok	Paparan asap rokok	Perlakuan
1	KN	-	Aquades
2	K(-)	+	Aquades
3	P1	+	Ekstrak Etanol Buah Delima 350mg/KgBB/oral
4	P2	+	Ekstrak Etanol Buah Delima 700mg/KgBB/oral

5	P3	+	Ekstrak Etanol Buah Delima 1400mg/KgBB/oral
---	----	---	---

Keterangan:

- KN adalah kelompok kontrol normal yang tidak diberikan paparan asap rokok dan hanya diberikan aquades.
- K(-) adalah kelompok kontrol negatif yang diberikan paparan asap rokok dan aquades.
- P1 adalah kelompok perlakuan pemberian paparan asap rokok dan ekstrak etanol buah delima dengan dosis 350mg/KgBB setiap hari.
- P2 adalah kelompok perlakuan pemberian paparan asap rokok dan ekstrak etanol buah delima dengan dosis 700mg/KgBB setiap hari.
- P3 adalah kelompok perlakuan dengan pemberian paparan asap rokok dan ekstrak etanol buah delima dengan dosis 1400mg/KgBB setiap hari.

Pemaparan asap rokok menggunakan spuit injeksi yang ujungnya disambung dengan rokok kretek kemudian rokok dibakar dan dimasukkan ke dalam kandang perlakuan sambil dipompa dengan spuit injeksi. Kandang mencit didesain khusus tanpa ventilasi kecuali lubang pipa, sehingga sebagian besar asap rokok tersebut dapat dihirup oleh mencit. Pemaparan asap rokok ditunggu sampai rokok kretek telah habis dan ditunggu sekitar 5 menit agar asap yang didalam kandang tidak banyak menyebar. Saluran pipa dibuka lagi agar mencit dapat bernafas secara normal. Perlakuan dilakukan dari hari ke-1 hingga hari ke-35.

3. Pengambilan data

Mencit diterminasi pada hari ke-36 dengan cara dislokasi *vertebrae cervical* sesuai standar kelayakan etik (Hamilton 2012) dan mencit yang sudah mati akan dikubur sesuai dengan prosedur pembuangan limbah biologik. Kemudian hepar diambil dan diletakkan di tabung berisi cairan pengawet buffer

formalin 10% dengan 1 bagian hepar dan 9 bagian buffer formalin 10% selama 24 jam. Selanjutnya hepar diblok dengan paraffin, dipotong, dan diletakkan pada kaca objek glass. Blok kemudian dicat dengan HE. Sampel hepar dideparafinasi dan direhidrasi jaringan menggunakan PBS. Sampel dicuci dengan menggunakan aquadest dan dideferensiasi dengan asam asetat 1 % selama satu menit, dibuang dan dicuci kembali menggunakan aquadest. Kemudian slide didehidrasi, dibersihkan dan ditutup dengan kaca penutup.

4. Pembuatan Preparat Histologi Hepar

Tiap hewan percobaan diambil heparnya. Preparat Hepar terdiri dari tiga lobules, di setiap preparat hepar diamati dan diambil salah satu lobulus hepar yang terlihat kerusakannya paling berat. Lalu diamati dalam lapang pandang 200x perbesaran sebanyak 10 lapang pandang. Pembuatan preparat histopatologi hepar dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta.

K. Analisa Data

Data yang diperoleh akan diuji normalitas dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan *Levene Test*. Jikadidapatkan data berdistribusi normal dan homogen dengan nilai signifikansi $p > 0,05$, bila hasil $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan uji *kruskal-wallis* dengan hasil uji *kruskal-wallis* diharapkan ($p < 0,05$). Hasil uji *kruskal-wallis*, mempunyai arti sample dinyatakan setidaknya ada dua kelompok yang berbeda signifikansi. maka dilanjutkan uji *pos hoc Man whitney*.

Prosedur Penelitian

