

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* kosterm.) yang diperoleh dari desa Kapayang Kecamatan Tapin Tengah, Kab. Tapin. Kalimantan Selatan pada bulan November 2018.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm) diambil secara acak berwarna hijau, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dan tidak rusak yang diperoleh di desa Kapayang Kecamatan Tapin Tengah, Kab. Tapin. Kalimantan Selatan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah aktivitas ekstrak daun mangga kasturi hasil maserasi dengan pelarut etanol 96% terhadap kadar glukosa dan jumlah pulau, perbaikan profil histopatologi pankreas tikus yang diinduksi aloksan.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% dalam berbagai dosis.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah penurunan kadar gula darah dan kondisi organ pankreas pada tikus setelah mendapat perlakuan dengan ekstrak

etanol 96% dengan dosis yang berbeda-beda. Variabel tergantung merupakan variabel akibat dari variabel utama.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi hewan uji yang meliputi berat badan, jenis kelamin, usia, galur, kondisi laboratorium dan peneliti sendiri.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun mangga kasturi adalah daun yang berwarna hijau, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda yang diperoleh dari pohon mangga kasturi yang berasal dari Rantau, Kalimantan Selatan.

Kedua, serbuk daun mangga kasturi adalah serbuk yang diperoleh dari hasil pengeringan, penggilingan dan pengayakan daun mangga kasturi dengan menggunakan mesh 40.

Ketiga, ekstrak daun mangga kasturi adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% kemudian dipekatkan di atas *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

Keempat, adalah tikus jantan putih yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 180-220 g yang diinduksikan dengan aloksan 150 mg/kg BB sehingga mengalami diabetes.

Kelima, metode uji diabetes injeksi aloksan adalah metode yang digunakan dengan upaya merusak sebagian organ pankreas tikus.

Keenam, glibenklamid adalah serbuk obat hipoglikemik oral glibenklamid yang diperoleh dari apotek Pajang

Ketujuh, kondisi histopatologi jaringan pankreas adalah perbaikan sel beta pankreas dan penurunan persentase nekrosis sel islet pulau Langerhans pankreas terhadap jumlah sel normal.

Kedelapan, dosis efektif adalah dosis dari ekstrak daun mangga kasturi yang memiliki aktivitas menurunkan kadar gula darah dan memperbaiki sel beta pankreas serta menurunkan persentase nekrosis sel islet pulau Langerhans yang setara dengan kontrol positif.

C. Alat, Bahan dan Hewan Uji

1. Alat

Alat untuk membuat simplisia yaitu oven dengan suhu rendah dan konstan, mesin penggiling dan ayakan ukuran mesh no. 40. Alat penyari yang digunakan adalah seperangkat alat maserasi, evaporator, bejana maserasi, kain fanel, neraca elektrik, pipet, tabung reaksi, beaker glass. Alat untuk mengukur kadar air adalah *Sterling-Bidwell*. Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji adalah timbangan, jarum oral, spuit injeksi insulin 1.0 ml merck, pipa kapiler, gelas ukur, beaker glass dan kandang tikus. Alat yang digunakan untuk mengukur kadar glukosa darah tikus adalah glukometer merek *Gluko Dr*. Alat yang digunakan untuk preparat histopatologi adalah rangkaian alat bedah (scalpel, pinset, pisau, gunting, jarum, dan meja lilin), mikrotom putar (*rotary microtome*), object glass dan deck glass, mikroskop cahaya Olimphus CH20.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mangga kasturi (*Mangifera Casturi* Kosterm) yang segar, secara acak berwarna hijau, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dan tidak rusak yang diperoleh dari Rantau, Kalimantan Selatan.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96% sebagai larutan penyari. untuk uji farmakologi digunakan aloksan monohidrat, glibenklamid, *Carbonyl Metil Cellulose Natrium* (CMC-Na) 0,5%, larutan fisiologis NaCl 0,9% dan aquadest. Untuk penetapan kadar gula darah menggunakan stik gluco dr. Bahan untuk pengamatan histopatologi adalah formalin PA, larutan warna *Haematoxylin Eosin*, formaldehid, etanol, xylen dan alkohol. Untuk uji identifikasi senyawa tanaman alkohol, anhidrida asam asetat, kloroform, asam sulfat, HCL 2N, serbuk magnesium, amil alkohol, xylene, asam klorida, besi (III) klorida dan air suling.

3. Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur Wistar jantan berumur 2-3 bulan dengan berat badan antara 150-220 gram sebanyak 30 ekor. Pengelompokkan dilakukan secara acak 5 ekor per kelompok.

Semua tikus dipelihara dan dirawat dengan cara yang sama, mendapat perlakuan yang sama, ukuran kandang yang sesuai dengan temperatur $\pm 10^{\circ}\text{C}$. Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap, selama penelitian kebutuhan makanan dan minuman harus selalu terkontrol agar kondisi tikus tetap sehat.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman kasturi

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan makroskopis dan mikroskopisnya. Hal ini dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis tanaman pada pustaka yang dibuktikan dengan determinasi yang dilakukan di Laboratorium Terpadu Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan, pengeringan dan pembuatan serbuk

Sampel yang digunakan adalah daun mangga kasturi yang diperoleh dari Kapayang, kabupaten Tapin, Kalimantan Selatan. Daun kasturi kemudian dicuci dengan air untuk membersihkan kotoran dan debu yang menempel pada daun lalu ditiriskan dan dikeringkan dengan sinar matahari. Setelah itu, dilakukan sortasi kering dan diserbukan dengan menggunakan blinder serta diayak dengan menggunakan pengayak no.40 sampai didapatkan serbuk daun mangga kasturi yang diinginkan.

3. Penetapan kadar air daun mangga kasturi

Penetapan kadar air daun mangga kasturi dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Caranya dengan menimbang serbuk daun mangga kasturi sebanyak 20 gram dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*, tahap selanjutnya dipanaskan. Cairan pembawa yang digunakan adalah xylene karena xylene memiliki titik didih lebih tinggi dari pada air dan tidak bercampur dengan air sehingga memudahkan dalam penetapan kadar air. Pemanasan dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi (kurang lebih 1 jam), kemudian diukur kadar airnya dengan melihat volume pada skala alat tersebut dan dihitung % air

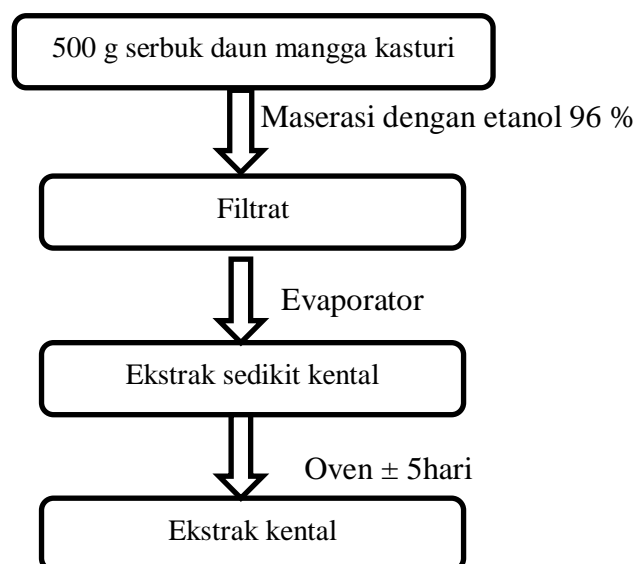
dari berat sampel (Sudarmadji *et al* 1997). Selanjutnya dihitung kadar air dalam satuan persen dengan rumus:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

4. Pembuatan ekstrak daun mangga kasturi

Pembuatan ekstrak etanol daun mangga kasturi dilakukan dengan cara mengambil daun yang telah diserbuk, kemudian ditimbang sebanyak 500 gram. Serbuk masukan ke dalam botol maserasi berwarna gelap dan ditambah etanol 96% sebanyak 5000 ml. Rendam selama 6 jam pertama sekali-kali diaduk, kemudian diamkan selama 24 jam sambil sering diaduk dan pengocokan berulang. Setelah 24 jam, saring filtrat dengan kain flanel. Ulangi proses penyarian dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama.

Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap dengan tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental. Persen rendemen dihitung berdasarkan persentase bobot per bobot (b/b) antara rendemen yang didapatkan dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan (Depkes 2008).



Gambar 6. Skema pembuatan ekstrak etanol serbuk daun mangga kasturi

5. Penetapan kadar air ekstrak daun mangga kasturi

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluen. Toluene yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu. Kemudian ditimbang seksama

ekstrak sebanyak 10 g dan masukkan ke dalam labu alas bulat dan tambahkan toluen yang telah dijenuhkan. Labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit, setelah toluen mulai mendidih, penyulingan diatur 2 tetes/detik, lalu 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling dilanjutkan pemanasan selama 5 menit. Biarkan tabung penerima dingin hingga suhu kamar. Volume air dibaca sesudah toluen dan air memisah sempurna. Lakukan replikasi sebanyak tiga kali kemudian hitung persentasenya (Saifudin *et al* 2011).

6. Identifikasi kandungan senyawa

6.1. Identifikasi flavonoid. Ekstrak etanol daun mangga kasturi dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan sedikit serbuk Mg, ditambah 2-3 tetes HCL dan 1 ml amil alkohol, lalu dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah/kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Rahayu *et al.* 2015).

6.2. Identifikasi tanin. Sejumlah ekstrak daun mangga kasturi ditambah ± 20 ml air panas kemudian dididihkan selama 15 menit, setelah dingin disaring. Sebanyak 5 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi larutan besi (III) klorida 1%. Jika tanin positif maka akan terbentuk warna hijau violet setelah direaksikan dengan larutan besi (III) klorida (Depkes 1995).

6.3. Identifikasi saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun mangga kasturi dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah air panas ± 10 ml dan dikocok kuat-kuat. Tambahkan 1 tetes HCl 2N dan amati jika terjadi reaksi positif yang ditunjukkan dengan buih yang terbentuk setinggi 1-10 cm dan tidak hilang (Hayati 2010).

6.4. Identifikasi alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan metode Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambah dengan 1 ml HCl 2 M dan 9 ml *aquadest* dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian, masing-masing ditambah dengan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Terbentuknya endapan putih pada pereaksi Mayer menunjukkan hasil yang positif pada alkaloid, terbentuknya warna coklat kemerahan pada pereaksi Wagner menunjukkan hasil positif alkaloid,

dan terbentuknya warna jingga menunjukkan hasil positif alkaloid (Widiastuti 2014).

7. Penentuan dosis

7.1. Penentuan dosis aloksan. Dosis aloksan yang digunakan untuk membuat tikus diabetes adalah 150 mg /kg bb secara intraperitoneal (Sujono & Sutrisna 2010). Tikus yang digunakan adalah tikus yang memiliki berat sekitar 200 g, sehingga didapatkan dosis aloksan yang digunakan pada penelitian ini adalah 30 mg/200 g berat badan tikus (Maharani 2018).

7.2. Penentuan dosis glibenklamid. Dosis glibenklamid diambil berdasarkan penggunaannya pada manusia, yaitu 5 mg untuk 70 kg BB manusia. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018. Sehingga, dosis glibenklamid untuk tikus pada penelitian ini adalah 0,09 mg/200 gram BB tikus (0,45 mg/kg BB tikus) (Dionysius *et al* 2017).

8. Pembuatan sediaan uji

8.1 Aloksan monohidrat. Larutan aloksan monohidrat dengan konsentrasi 1% dibuat dengan cara melarutkan 1 g aloksan monohidrat dalam larutan garam fisiologi pada volume 100 ml. Aloksan digunakan untuk penginduksi diabetes (Maharani 2018).

8.2 CMC Na 0,5%. CMC Na 0,5% digunakan sebagai kontrol negatif. CMC Na 0,5% dibuat dengan cara melarutkan 0,5 g CMC Na 0,5% dengan aquadest hangat sedikit demi sedikit, kemudian dimasukkan ke dalam mortir dan digerus sampai halus. Setelah itu, aquadest ditambahkan hingga 100 ml dan diaduk. (Nafila *et al* 2013)

8.3 Glibenklamid. Suspensi glibenklamid dibuat dalam kadar 0,09% mg/mL. Cara pembuatannya dimulai dengan menimbang serbuk glibenklamid sebanyak 9 mg, kemudian disuspensikan ke dalam larutan CMC Na 0,5% sampai 100 ml (Nafila *et al* 2013).

8.4 Larutan garam fisiologis. Larutan fisiologis 0,9% dibuat dengan cara melarutkan 0,9 g NaCl dalam air suling pada volume 100 ml dibuat untuk melarutkan aloksan monohidrat (Indrasari 2018).

9. Perlakuan hewan uji

Tikus ditimbang dan diberi tanda. Sebelum perlakuan, selama satu minggu tikus diadaptasi terlebih dahulu untuk menyesuaikan diri dengan lingkungan. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan dengan berat rata-rata 180-220 gram. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 30 ekor yang secara acak dibagi dalam 6 kelompok :

Kelompok 1 : Kontrol normal (hanya diberi makan dan minum)

Kelompok 2 : Kontrol negatif, tikus diberikan CMC Na 0,5%

Kelompok 3 : Kontrol positif, tikus diberikan glibenklamid dosis 0,45 mg/kg BB

Kelompok 4 : Ekstrak etanol 96% daun mangga kasturi dosis 125 mg/kg BB tikus selama 14 hari

Kelompok 5 : Ekstrak etanol 96% daun mangga kasturi 250 mg/kg BB tikus selama 14 hari

Kelompok 6 : Ekstrak etanol 96% daun mangga kasturi 500 mg/kg BB tikus selama 14 hari

10. Prosedur uji diabetes aloksan

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan brumur 2-3 bulan dengan berat rata-rata 180-220 gram. Tikus dibagi 6 kelompok dan dipuasakan selama 18 jam kemudian. Hari pertama sebelum tikus diberikan perlakuan, dilakukan pengambilan darah untuk mengukur kadar glukosa awal (T_0), setelah itu pada hari yang sama juga diberikan larutan aloksan 180 mg/kg BB tikus secara intraperitoneal. Setelah 4 hari diinduksi dengan aloksan, setiap hewan uji dengan kadar gula darah >200 mg/dL dikelompokkan, kemudian diambil darahnya untuk mengukur kadar glukosa hari pertama (T_1).

Pengambilan darah dilakukan pada pembuluh darah mata tikus. Masing-masing kelompok diberikan suspensi CMC Na 0,5% (Kelompok 2, kontrol negatif), suspensi glibenklamid 0,45 mg/kg BB tikus (Kelompok 3, Kontrol positif), suspensi ekstrak etanol daun mangga kasturi dengan dosis variasi (kelompok 4, 5 dan 6) diberikan setiap hari pada pagi hari selama 14 hari. Untuk kelompok normal hanya diberikan pakan dan minum *ad libitum* (kelompok 1)

11. Pengambilan sampel

Pada akhir penelitian, hewan uji dikorbankan dan organnya diambil untuk dihitung berat organ dan persen indeks organ. Hewan uji dikorbankan dengan cara *decapitation* (perusakan otak lewat leher). *Decapitation* dilakukan dengan jalan memotong kepala hewan dengan menggunakan peralatan tajam dengan tujuan untuk memutus kepekaan saraf tulang belakang.

12. Penetapan kadar glukosa darah

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan setelah 16jam (T₀), 4 hari setelah diinduksi aloksan (T₁) dan hari ke 14 (T₂) setelah pemberian sediaan uji. Pengukuran kadar glukosa darah dengan metode Glukometer dengan (GlucoDr Biosensor AGM-2100). Cuplikan darah yang diambil dari vena lateralis ekor tikus dalam jumlah sangat sedikit yang berkisar hanya 1µl disentuhkan dalam *test strip*, kemudian alat tersebut akan segera mengukur kadar glukosa darah setelah strip terisi oleh darah, darah akan masuk ke dalam strip melalui aksi kapiler. Glukosa yang ada dalam darah akan bereaksi dengan glukosa oksidase dan kalium ferrosianida yang ada dalam strip dan akan dihasilkan kalium ferrosianida. Kalium ferrosianida yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi glukosa yang ada dalam sampel darah. Oksidasi kalium ferrosianida akan menghasilkan muatan listrik yang akan diubah oleh glukometer untuk ditampilkan sebagai konsentrasi glukosa pada layar.

13. Pembuatan preparat histopatologi

Pertama, organ pankreas tikus yang telah didekapitasi diambil dan dimasukkan dalam pot plastik. Organ langsung difiksasi dengan menggunakan formalin 10% PA agar preparat tidak cepat rusak, dan diberi label pada pot kode tikus sesuai kelompok perlakuan. Setelah itu, dilakukan pemotongan pada organ pankreas yang telah difiksasi tadi dan dimasukkan ke dalam tissue cassette dan dicuci di bawah air mengalir selama 30 menit.

Kedua, tahap dehidrasi yaitu proses penarikan cairan jaringan. Jaringan pankreas yang telah dimasukkan ke dalam tissue cassette direndam dengan menggunakan etanol secara bertingkat berturut-turut etanol 70%, 80% dan 90% masing-masing selama 1 jam, kemudian etanol absolut I selama 1 jam, etanol absolut II selama 1 jam dan etanol absolut III selama 1 jam.

Ketiga, dilakukan proses penjernihan (*clearing*), dengan menggunakan larutan xylene, untuk menghilangkan alkohol (dealkoholisasi). Dimulai dengan memasukkan jaringan pankreas ke dalam xylene I selama 20 menit, kemudian xylene II selama 20 menit dan selanjutnya xylene III selama 20 menit.

Keempat, dilakukan proses infiltrasi parafin. Organ dimasukkan ke dalam parafin panas, untuk membuat jaringan menjadi lebih keras dan lebih mudah dipotong dengan mikrotom. Proses pertama yang dilakukan adalah dengan memasukan jaringan ke dalam parafin I, parafin II dan parafin III masing-masing selama 1 jam pada suhu 60°C.

Kelima, dilakukan proses selanjutnya yakni tahap *embedding* atau penanaman jaringan dalam parafin, dengan memasukan jaringan ke dalam blok parafin. Pemotongan dengan mikrotom menghasilkan lapisan dengan ketebalan 5 mikrometer, lapisan jaringan diletakkan di atas kaca objek untuk siap diwarnai.

Keenam, tahap pewarnaan hematoxylin eosin. Tahap ini diawali dengan deparafinisasi dengan xylen yang bertujuan untuk menghilangkan parafin pada jaringan. Dimulai dengan memasukkan jaringan ke xylen I selama 3 menit, dan xylen II selama 3 menit.

Ketujuh, dilakukan proses rehidrasi yang bertujuan mengembalikan cairan ke dalam jaringan dengan menggunakan larutan etanol. Tahap pertama yaitu dengan memasukkan jaringan ke dalam etanol absolut I dan absolut II masing-masing selama 3 menit, selanjutnya jaringan dimasukkan ke dalam etanol 80% dan 70% secara bergantian masing-masing selama 3 menit.

Kedelapan, dilakuukan tahap *staining*, dimana jaringan dimasukkan ke dalam larutan pewarna. Jaringan dimasukkan ke dalam pewarna hematoxylin selama 10 sampai 20 menit, kemudian diamati apakah jaringannya sudah berwarna ungu. Selanjutnya, jaringan yang sudah diwarnai tadi dicuci di bawah air mengalir selama 10 menit. Setelah itu, pewarnaan dilanjutkan dengan memasukkan sediaan ke dalam pewarna eosin selama 10 menit.

Kesembilan, dilakukan rehidrasi, tujuannya untuk menarik air dari jaringan agar awet dan tidak cepat rusak. Jaringan dicelupkan 4 kali secara berurutan ke dalam larutan etanol 70%, 80% dan 90% masing-masing selama 30 detik.

Selanjutnya direndam dengan etanol absolut dicelupkan sebanyak 4 kali, masing-masing selama 1 menit.

Kesepuluh dilakukan proses penjernihan atau *clearing*, dengan memasukan jaringan ke dalam larutan xylen I dan dilakukan *mounting*, yaitu penutupan sediaan dengan menggunakan gelatin sebagai perekat dan ditutup dengan deg glass (Lerebulan 2014).

14. Perlakuan hewan uji pasca bedah

Pada akhir penelitian setelah hewan uji dibedah dan diambil organnya, selanjutnya jasad hewan uji dikubur dengan membuat lubang dengan kedalaman minimal setengah meter untuk menghindari terbongkarnya tempat penguburan. Hewan uji dikubur di tempat yang telah disediakan.

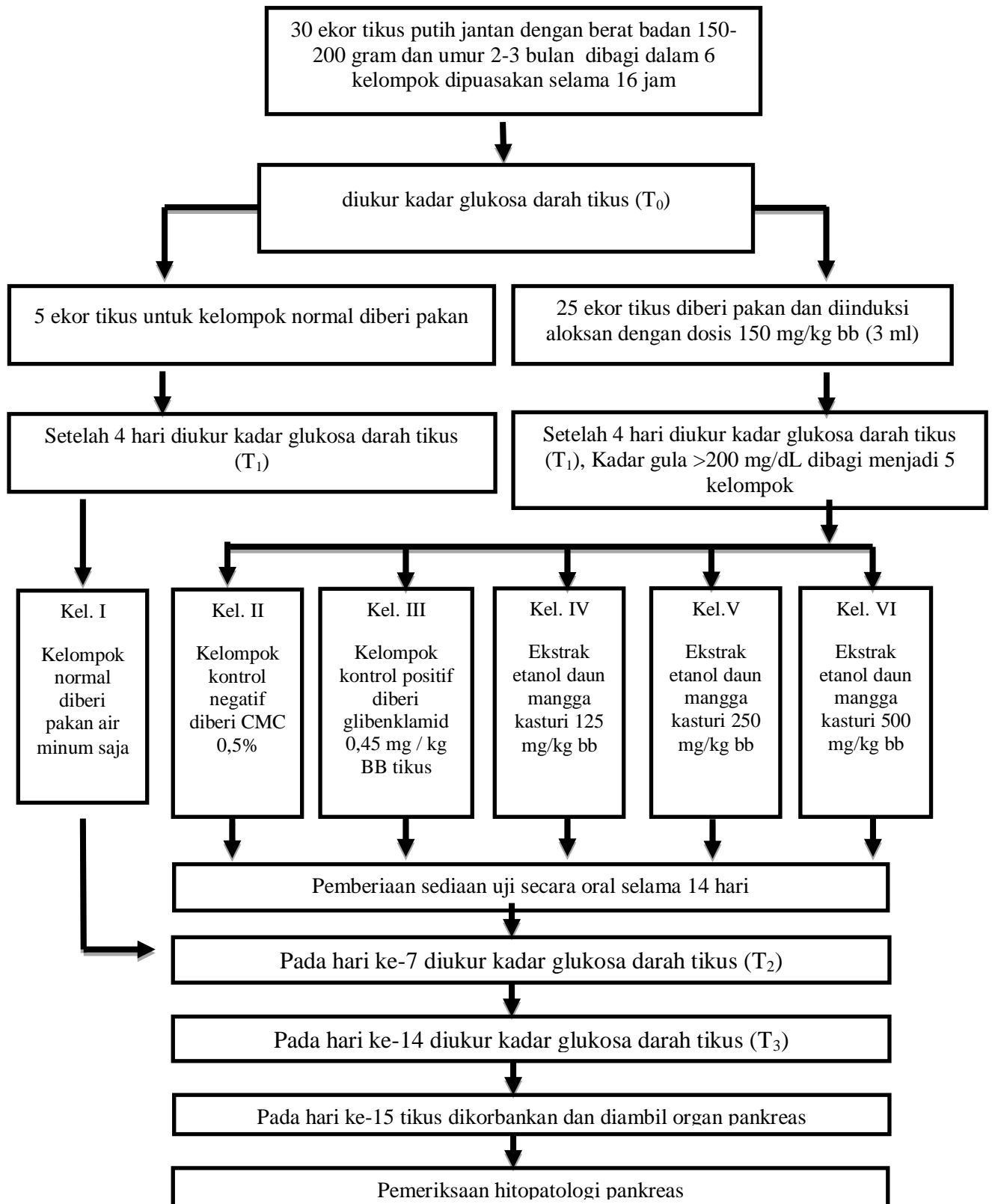
15. Pemeriksaan histopatologi

Pembacaan sampel dilakukan untuk mengamati letak kerusakan jaringan yang dikehendaki dan menginterpretasikan parameter perubahan histologi jaringan pankreas pada preparat uji. Preparat difoto dengan menggunakan mikroskop Olympus BX41 dan software Olympus DP2-BSW yang dimulai dari perbesaran 4x, 10x, 20x, dan 40x dan 100x.

E. Analisa Statistik

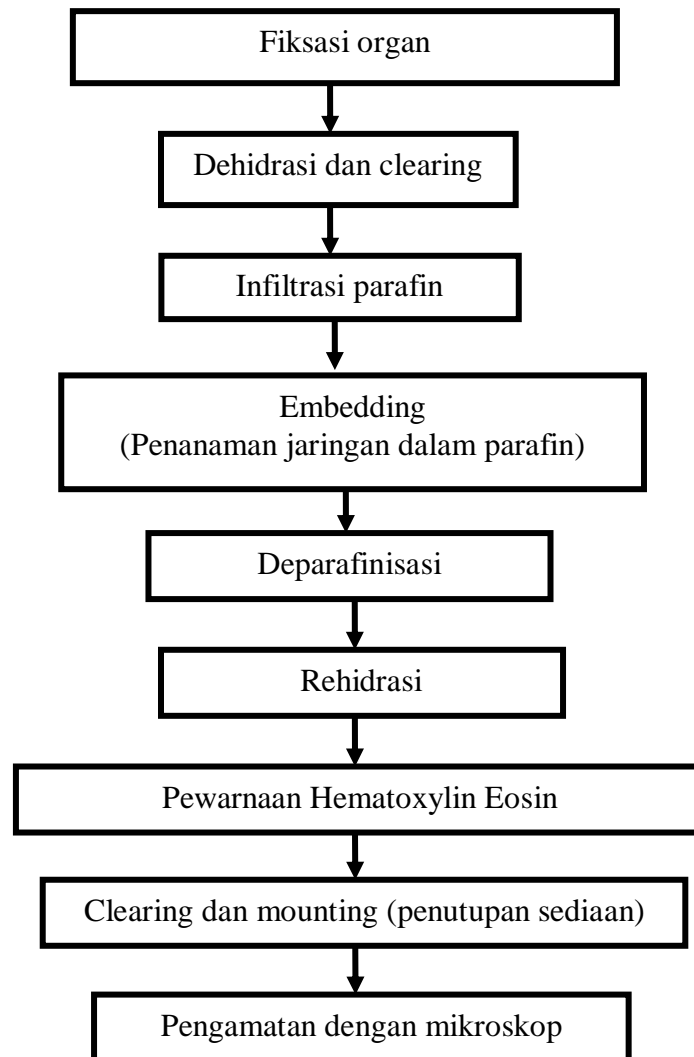
Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini akan di pilih berdasarkan data yang diperoleh. Data kuantitatif hasil penelitian dinyatakan sebagai rata-rata (mean) (\pm) standar deviasi (SD) dan data kualitatif diperoleh dari hasil gambaran histopatologi jaringan pankreas dengan pewarnaan hematosin dan eosin. Analisis data secara statistik, uji *saphiro-wilk* untuk mengetahui bahwa data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak, apabila data terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji ANOVA, namun bila data tidak terdistribusi normal dapat digunakan uji non parametrik. Kriteria uji yaitu jika nilai signifikasi lebih kecil dari 0,05 maka data dikatakan tidak terdistribusi normal. Jika data memenuhi syarat untuk uji ANOVA, analisis dilanjutkan dengan *Post Hoc Tes* untuk mengetahui perbedaan mean antara kelompok tersebut signifikasikan atau tidak dengan menggunakan program SPSS *for Windows Release*.

Alur Penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian

Alur Pemeriksaan Histopatologi



Gambar 8. Alur Pemeriksaan Histopatologi