

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi pada penelitian ini adalah daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lourr) Merr) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Januari 2019.

##### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lourr) Merr) yang berwarna hijau tua.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pada penelitian ini adalah aktivitas dari ekstrak etanol daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lourr) Merr) hasil maserasi dengan pelarut etanol 96 % terhadap kadar glukosa dan diameter, jumlah pulau, densitas pulau dan jumlah sel endokrin pulau Langerhans pankreas tikus yang diinduksi aloksan.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa.

Variabel tergantung adalah akibat dari variabel utama. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah perubahan struktur histopatologi pankreas dan selisih kadar glukosa darah pada tikus sebelum dan setelah pemberian ekstrak etanol 96 % daun sambung nyawa dengan dosis yang berbeda-beda.

Variabel terkontrol 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 terkontrol pada penelitian ini adalah metode ekstraksi daun sambung nyawa, kondisi fisik hewan uji meliputi berat badan tikus, galur, jenis kelamin, kondisi laboratorium, zat penginduksi, dan peneliti.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun sambung nyawa adalah daun yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun sambung nyawa adalah serbuk yang diperoleh dari daun sambung nyawa yang telah dikeringkan, digiling dan diayak dengan ayakan nomor mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun sambung nyawa adalah ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk daun sambung nyawa dengan pelarut etanol 96%, selanjutnya dipekatkan menggunakan *vakum evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat daun sambung nyawa.

Keempat, hewan uji dalam penelitian ini tikus jantan yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan sekitar 180-220 g yang mengalami diabetes akibat induksi aloksan.

Kelima, metode induksi diabetes adalah menggunakan induksi zat diabetogenik aloksan. Aloksan adalah senyawa diabetogenik yang digunakan untuk merusak sebagian organ pankreas tikus.

Keenam, glukometer adalah alat untuk menetapkan kadar gula darah berdasarkan reaksi kolorimetrik-enzimetik. Cuplikan diambil dari vena lateralis ekor tikus dalam jumlah sangat sedikit yang berkisar hanya 1  $\mu$ l disentuhkan dalam *test strip*, kemudian alat tersebut akan segera mengukur kadar glukosa darah setelah strip terisi oleh darah.

Ketujuh, kondisi histopatologi pankreas tikus adalah peningkatan diameter sel endokrin pankreas pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi aloksan.

Kedelapan, dosis efektif adalah dosis terkecil dari ekstrak etanol daun sambung nyawa yang mampu menurunkan kadar gula darah dan mampu

meningkatkan diameter sel endokrin pankreas tikus yang setara dengan kontrol positif.

### C. Bahan, Alat dan Hewan Uji

#### 1. Bahan

**1.1. Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sambung nyawa yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

**1.2. Bahan Kimia.** Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 96%, aloksan monohidrat, glibenklamid, Carboxy Methyl Cellulose (CMC) Na 0,5%, larutan fisiologis (NaCl 0,9%) dan aquadest. Bahan untuk pengamatan histopatologi adalah formalin PA, larutan warna Hematoxylin Eosin, etanol, parafin, xylene dan alkohol.

#### 2. Alat

Alat yang dipakai untuk membuat simplisia daun sambung nyawa adalah oven, mesin penggiling, ayakan nomor mesh 40. Alat penyari untuk daun sambung nyawa yang digunakan antara lain alat-alat gelas, peralatan maserasi yang terdiri dari botol cokelat, kain flanel, kertas saring dan *vacuum evaporator*. Alat yang digunakan untuk mengukur kadar air adalah *Sterling-Bidwell*, alat-alat gelas, timbangan elektrik, mortir dan stamper, batang pengaduk. Alat yang digunakan untuk perlakuan hewan uji yaitu timbangan, spuit oral, jarum suntik dan kandang tikus.

#### 3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih galur wistar kelamin jantan, umur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 180-220 g sebanyak 30 ekor. Pengelompokan dilakukan secara acak masing-masing 5 ekor per kelompok. Semua tikus dipelihara dengan cara yang sama, mendapat diet yang sama, ukuran kandang yang sesuai dengan temperature  $30\pm 10^{\circ}\text{C}$ .

Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Selama penelitian kebutuhan makanan dan minuman harus selalu terkontrol agar mencegah kematian tikus terutama saat diinduksi aloksan untuk membuat tikus diabetes. 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. Setelah dikorbankan di ambil organ yang dibutuhkan dan masukan semua sisa organ tikus yang tidak terpakai kedalam kantong plastik, kemudian kantong plastik yang berisi organ tidak terpakai di serahkan ke bagian Farmakologi dan Toksikologi untuk dilakukan insinerasi. Kemudian bersihkan area kerja sisa pembedahan dengan sabun jika perlu di semprot dengan alkohol.

#### **D. Jalannya Penelitian**

##### **1. Determinasi tanaman**

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi daun sambung nyawa (*Gynura procumben* (Lourr) Merr) yang bertujuan untuk menetapkan kebenarannya dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada daun sambung nyawa yang dibuktikan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta, Surakarta, Jawa Tengah.

##### **2. Pengambilan dan pembuatan serbuk daun sambung nyawa**

Daun sambung nyawa diambil secara acak dengan memilih daun tanaman yang berwarna hijau dan bebas hama, sampel masih dalam keadaan segar yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel daun sambung nyawa yang diperoleh disortasi basah lalu dicuci bersih menggunakan air mengalir dan ditiriskan. Sampel kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C, kemudian dilakukan sortasi kering dan diserbukkan dengan menggunakan blender kemudian diayak dengan pengayak nomor 40.

##### **3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun sambung nyawa**

Susut pengeringan diukur dengan menggunakan alat *moisture balance*. Penggunaan alat ini dengan cara yaitu alata dipanaskan terlebih dahulu selama kurang lebih 10 menit, timbang 2 gram serbuk yang akan diuji ke atas wadah alumunium secara merata. Kemudian atur temperatur alat pada suhu 105<sup>0</sup>C, alat

dinyalakan tunggu sampai alat selesai membaca susut pengeringan, catat nilai yang terbaca pada alat.

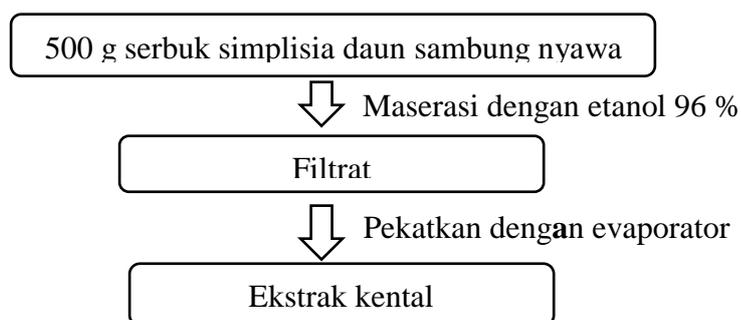
#### 4. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun sambung nyawa

Penetapan kadar air daun sambung nyawa dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Caranya dengan menimbang serbuk daun sambung nyawa sebanyak 20 gram dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut toluen jenuh air sebanyak 200 ml (Toluen jenuh air dibuat dengan cara mengocok 200 ml toluen dengan 20 ml air, biarkan memisah dan buang lapisan air) sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*, tahap selanjutnya dipanaskan dengan api kecil. Pemanas dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi, kemudian diukur kadar airnya dengan melihat volume pada skala alat tersebut dan dihitung persen kadar airnya (DepKes 1995).

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

#### 5. Pembuatan ekstrak etanol daun sambung nyawa

Proses pembuatan ekstrak etanol daun sambung nyawa dilakukan dengan cara maserasi (1:10) dengan menggunakan etanol 96 % sebagai cairan penyari. Serbuk daun sambung nyawa ditimbang 500 g, dimasukkan ke dalam botol maserasi kemudian dituangi dengan etanol 96 % (1 : 7,5), ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil sesekali diaduk. Cairan hasil ekstraksi disaring dengan kain flanel lalu dengan kertas saring. Ampas kemudian dimaserasi dengan cara yang sama dan dibiarkan selama 2 hari sambil sesekali diaduk hingga memperoleh 10 bagian pelarut (1:2,5). Filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, hasilnya disebut ekstrak etanol daun sambung nyawa.



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol 96 % serbuk daun sambung nyawa.

## **6. Penetapan sifat fisika ekstrak etanol daun sambung nyawa**

Pemeriksaan makroskopik meliputi bau, warna, dan rasa.

## **7. Identifikasi kandungan senyawa**

**7.1. Identifikasi flavonoid.** Sejumlah tertentu serbuk dan ekstrak dilembabkan dengan 100 ml air panas kemudian dididihkan selama 5 menit, disaring dan ambil filtratnya 5 ml dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan serbuk magnesium secukupnya, 1 ml asam klorida dan 2 ml amil alkohol, dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Terbentuknya warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan positif flavonoid (Sarker 2006).

**7.2. Identifikasi Tanin.** Sejumlah serbuk dan ekstrak ditambah 20 ml air panas kemudian dididihkan selama 15 menit, setelah dingin disaring. Sebanyak 5 ml filtrate dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi larutan besi (III) klorida 1%. Jika tannin positif maka akan terbentuk warna hijau violet setelah direaksikan dengan larutan besi (III) klorida (Depkes 1995).

**7.3. Identifikasi Saponin.** Sejumlah tertentu serbuk dan ekstrak ditambah dengan air panas 10 ml, didinginkan lalu dikocok selama 10 detik. Kemudian didiamkan selama 10 menit. Saponin positif bila muncul buih yang tinggi 1-10 cm. Pada penambahan satu tetes asam klorida 2N buih tidak hilang (Robinson 1995).

**7.4. Identifikasi steroid dan terpenoid.** Sejumlah tertentu serbuk dan ekstrak ditambahkan dengan satu tetes Liebermann Burchard yang terdiri dari 1 ml asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat 1 tetes. Terpenoid menunjukkan reaksi positif dengan adanya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan. Sedangkan, steroid menunjukkan reaksi positif apabila muncul cincin biru kehijauan (Sarker 2006).

**7.5. Identifikasi alkaloid.** Sebanyak 1 gram serbuk dan ekstrak dimasukan dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 5 tetes amonia pekat. Setelah itu, disaring kemudia ditambah 2 ml asam sulfat 2N dan dikocok hingga memberi hingga memberi lapisan atas dan bawah. Larutan dibagi menjadi 3 bagian, pada tabung pertama ditambahkan 1 tetes larutan mayer, adanya alkaloid ditandai

dengan terbentuknya endapan putih keruh, jika pada tabung kedua ditambah 1 tetes pereaksi Dragendorf dan terbentuknya endapan menandakan adanya alkaloid (Harborne 1987).

## **8. Penentuan dosis**

**8.1. Penentuan dosis aloksan.** Pada penelitian ini, aloksan yang digunakan pada penelitian ini adalah 150 mg/kg BB tikus dan diberikan secara intraperitoneal.

**8.2. 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 adalah 0,09 mg/200gram BB tikus atau 0,45 mg/kg BB tikus.

## **9. Pembuatan Bahan uji.**

**9.1. Glibenklamid.** Suspensi glibenklamid 0,09 mg/ml dibuat dengan cara melarutkan serbuk glibenklamid sebanyak 9 mg dalam CMC Na 0,5% sampai volume 100 ml.

**9.2. CMC Na 0,5%.** Larutan CMC Na digunakan sebagai kontrol negatif. Larutan CMC Na konsentrasi 0,5% dibuat dengan cara menimbang serbuk CMC Na sebanyak 500 mg kemudian dimasukkan ke dalam cawan penguap dan ditambah sedikit aquadest. Selanjutnya dipanaskan sampai mengembang kemudian dimasukkan ke dalam mortar dan menggerusnya dan menambahkan sedikit demi sedikit aquadest hingga 100 ml, diaduk hingga homogen.

**9.3. Larutan garam fisiologis.** Larutan fisiologis 0,9 % dibuat dengan cara melarutkan 0,9 g NaCl dalam air suling pada volume 100 ml.

**9.4. Aloksan.** Larutan aloksan 10 mg/ml adalah larutan yang digunakan sebagai penginduksi diabetes. Larutan aloksan dibuat dengan cara melarutkan serbuk aloksan sebanyak 1 gram dalam NaCl 0,9% hingga volume 100 ml.

## **10. Perlakuan hewan uji**

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur wistar dan tidak cacat dengan berat sekitar 180-220 g sebanyak 30 ekor yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus-

tikus tersebut kemudian diaklimatisasi selama satu minggu. Pengujian dilakukan dengan metode induksi aloksan terhadap 6 kelompok tikus. Tikus yang telah beradaptasi dengan lingkungan ditimbang dan masing-masing diberi tanda pengenal, tikus yang digunakan sebanyak 30 ekor yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Pada hari pertama sebelum tikus diberikan perlakuan, dilakukan pengambilan darah untuk pengukuran kadar glukosa awal ( $T_0$ ). Pada hari yang sama juga diberikan larutan aloksan monohidrat 180 mg/kg BB tikus secara intraperitoneal. Setelah 3 hari diinduksi dengan larutan aloksan, setiap hewan uji dengan kadar gula darah  $> 200$  mg/dL (positif diabetes) dikelompokkan kemudian diambil darahnya untuk pengukuran kadar glukosa darah hari pertama ( $T_1$ ). Kemudian, diberikan larutan uji secara oral setiap hari pada pagi hari selama 14 hari dan diukur kadar glukosa darah pada hari ketujuh ( $T_2$ ) dan hari keempatbelas ( $T_3$ ). Pada hari ke-15 semua tikus dikorbankan dengan cara didislokasi lehernya, setelah itu diambil organ pankreas untuk dilakukan uji histopatologinya.

Semua tikus dipuaskan terlebih dahulu selama 16 jam sebelum diberi perlakuan, perlakuan yang diberikan yaitu:

- Kelompok 1 : Kontrol normal tanpa perlakuan.
- Kelompok 2 : Kontrol negatif (tikus diberikan CMC Na 0,5%)
- Kelompok 3 : Kontrol positif (tikus diberikan glibenklamid 0,45 mg/kg BB)
- Kelompok 4 : Tikus diberikan ekstrak etanol daun sambung nyawa dengan dosis 75 mg/Kg BB.
- Kelompok 5 : Tikus diberikan ekstrak etanol daun sambung nyawa dengan dosis 150 mg/Kg BB
- Kelompok 6 : Tikus diberikan ekstrak etanol daun sambung nyawa dengan dosis 300 mg/Kg BB.

## **11. Penetapan kadar glukosa darah**

Pada hari pertama sebelum tikus diberikan perlakuan, dilakukan pengambilan darah untuk pengukuran kadar glukosa awal ( $T_0$ ), 3 hari setelah diinduksi aloksan ( $T_1$ ), pada hari ke-7 ( $T_2$ ) dan hari ke-14 ( $T_3$ ) setelah pemberian sediaan uji. Pengukuran kadar glukosa darah dengan alat glucometer. Cuplikan

darah yang diambil dari vena lateralis ekor tikus dalam jumlah sangat sedikit yang berkisar hanya 1 $\mu$ l disentuhkan dalam *test strip*, kemudian alat tersebut akan segera mengukur kadar glukosa darah setelah strip terisi oleh darah. Prosedur penggunaan glukometer adalah masukkan *check strip* untuk validasi alat dan mengetahui kondisi alat glukometer, dimana alat dinyatakan valid jika pada layar muncul tulisan “OK”, kemudian set kode alat dengan cara mencocokkan kode nomor yang muncul pada layar *GlucoDr test meter* dengan yang tertera pada tabung wadah *GlucoDr strip*. *Test strip* dimasukkan ke lubang alat *GlucoDr test meter*, ambil sampel darah dengan *GlucoDr lancing device*, tempelkan darah pada *test strip*, maka darah akan otomatis terserap ke dalam strip, pastikan test strip terisi penuh. Layar akan memunculkan angka 11, kemudian alat akan segera mengukur dengan menghitung mundur dari angka 11 sampai 1 dan akan keluar hasil pengukuran kadar glukosa darah. Pengukuran selanjutnya digunakan *test strip* yang baru.

## **E. Histopatologi Organ Pankreas**

### **1. 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 kode tikus sesuai kelompok perlakuan. Setelah itu, dilakukan pemotongan pada organ pankreas yang telah difiksasi dan dimasukkan ke dalam tissue cassette kemudian 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 dengan 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 (dealkoholasi) dimulai dengan

memasukkan jaringan pankreas ke dalam xylene I selama 20 menit, kemudian xylene II selama 20 menit dan selanjutnya xylene II selama 30 menit.

Keempat, dilakukan proses infiltrasi parafin. Organ dimasukkan ke dalam parafin panas untuk membuat jaringan menjadi lebih keras dan lebih mudah dipotong dengan mikroform. Proses pertama yang dilakukan adalah dengan memasukkan jaringan ke dalam parafin I, parafin II dan parafin III masing-masing selama 1 jam pada suhu 60<sup>0</sup>C.

Kelima, dilakukan proses penanaman jaringan (*Embedding*) dalam parafin dengan memasukkan 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 deparafinasi dengan xylene yang bertujuan untuk menghilangkan parafin pada jaringan dimulai dengan memasukkan jaringan ke dalam xylene I selama 3 menit dan xylene II selama 3 menit.

Ketujuh, dilakukan proses rehidrasi yang bertujuan mengembalikan cairan ke dalam jaringan dengan menggunakan larutan etanol. Hal ini dilakukan dengan cara memasukkan jaringan ke dalam etanol absolut I dan absolut II masing-masing selama 3 menit, setelah itu jaringan dimasukkan ke dalam etanol 80% dan 70% secara bergantian masing-masing selama 3 menit.

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

Kesembilan, dilakukan dehidrasi 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. Kemudian dicelupkan dalam etanol absolut sebanyak 4 kali, masing-masing selama 1 menit.

Kesepuluh dilakukan proses penjernihan dengan memasukan jaringan kedalam larutan xylene I dan dilakukan penutupan sediaan dengan menggunakan gelatin sebagai perekat dan ditutup dengan deck glass (Lerebulan 2018).

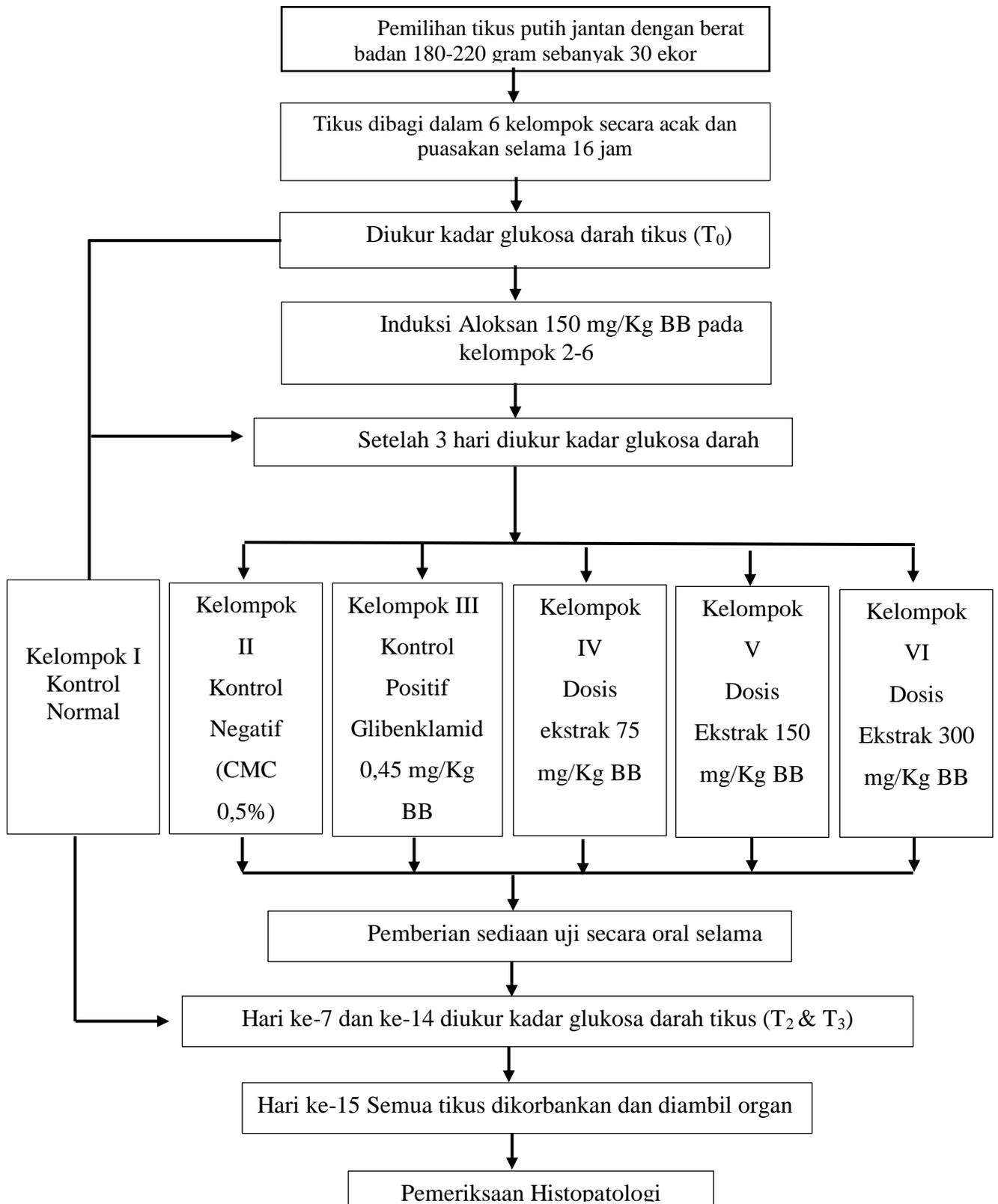
## **2. Pemeriksaan histopatologi**

Untuk dapat mengamati seluruh lapangan pandang pada daerah-daerah yang ditentukan, maka preparat jaringan pankreas diamati pada perbesaran 40 sampai 100 kali. Daerah yang diamati adalah daerah sinar yang merupakan tempat terdistribusinya sel-sel endokrin yang membentuk kumpulan tersendiri yang disebut pulau Langerhans dan sel dalam pulau Langerhans kemudian dihitung diameter sel endokrin pankreas tikus tersebut.

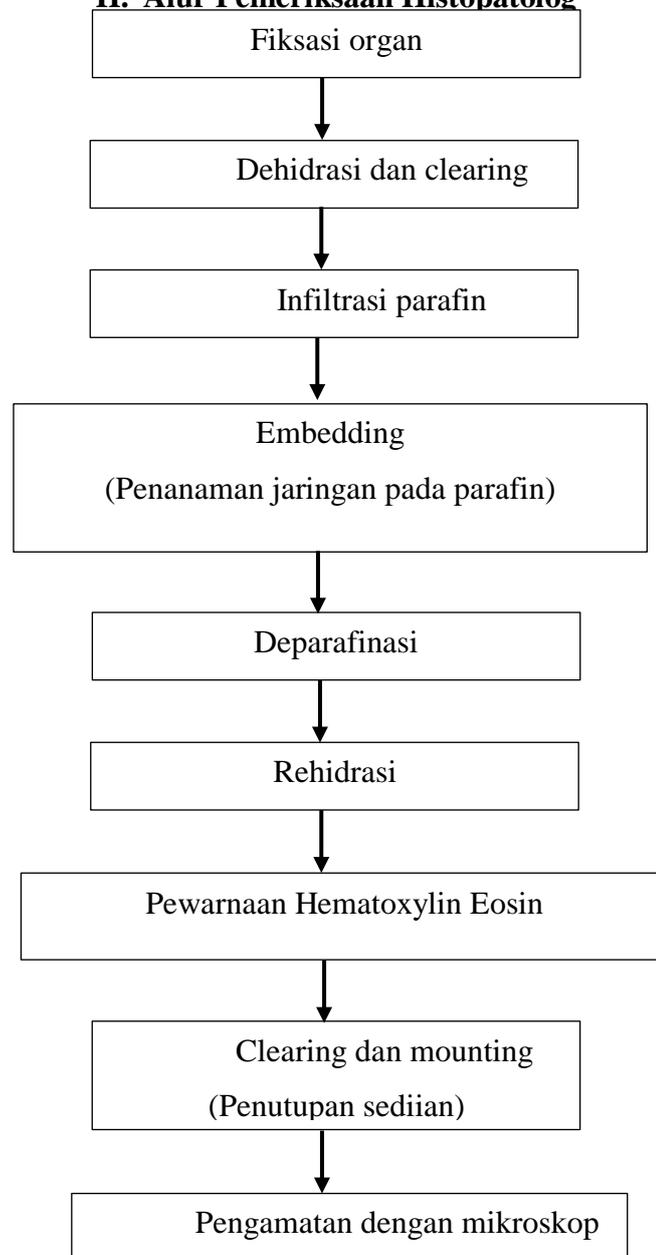
### **F. Analisa Statistik**

Analisa statistik yang pertama digunakan dalam penelitian ini adalah untuk melihat penurunan kadar glukosa darah, data diameter, densitas pulau dan jumlah sel endokrin yang diperoleh dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji distribusi normal (*Saphiro Wilk*) yang bertujuan untuk mengetahui data tersebut terdistribusi normal atau tidak. Jika data yang didapatkan terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ), analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik (*One Way ANOVA*) untuk mengetahui perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Jika hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan hasil normal ( $p > 0,05$ ), selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan bermakna diantara tiap-tiap kelompok perlakuan.

### G. Alur Penelitian



Gambar 2. Alur Penelitian.

**H. Alur Pemeriksaan Histopatolog****Gambar 3. Alur Pemeriksaan Histopatologi.**