

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Ruang lingkup penelitian

Ruang lingkup keilmuan penelitian ini adalah bidang Histologi, Patologi Anatomi, dan Farmakologi.

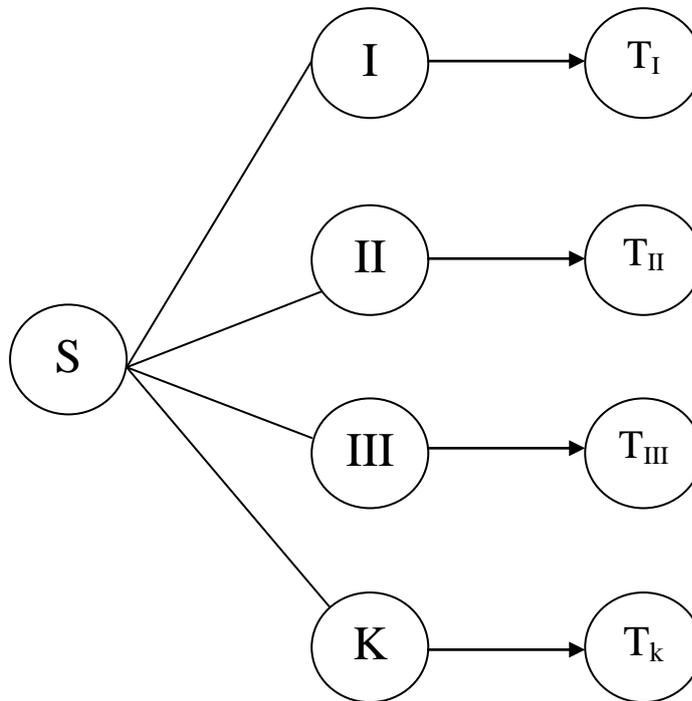
4.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian telah dilaksanakan selama 12 minggu, yaitu dimulai pada bulan Maret 2014 – Mei 2014. Mencit *balb/c* diadaptasi selama satu minggu, kemudian diberikan *methanil yellow* dosis bertingkat yang dicampur dalam aquades selama 30 hari dan terminasi dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang. Sedangkan pembuatan blok paraffin dan interpretasi hasil Patologi Anatomi sampel jaringan hepar dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

4.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *true eksperimental* laboratorik dengan rancangan *Post Test only Control Group Design* yang menggunakan hewan coba berupa mencit *balb/c* sebagai objek penelitian.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut :



Gambar 3. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

S = Kelompok Sampel

I = Kelompok Perlakuan I (*methanil yellow* peroral 4200 mg/kgBB/hari)

II = Kelompok Perlakuan II (*methanil yellow* peroral 2100 mg/kgBB/hari)

III = Kelompok Perlakuan III (*methanil yellow* peroral 1050
mg/kgBB/hari)

K = Kelompok Kontrol (*methanil yellow* peroral 0 mg/kgBB /hari)

T_I = Tes Kelompok Perlakuan I

T_{II} = Tes Kelompok Perlakuan II

T_{III} = Tes Kelompok Perlakuan III

T_k = Tes Kelompok Kontrol

4.4 Populasi dan sampel

4.4.1 Populasi target

Populasi target adalah mencit *balb/c* jantan.

4.4.2 Populasi terjangkau

Populasi terjangkau adalah mencit *balb/c* jantan diperoleh dari Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.

4.4.3 Sampel

4.4.3.1 Kriteria inklusi

- a) Mencit Balb/c
- b) Berat badan 20-25 gram
- c) Usia 2-3bulan
- d) Mencit dalam keadaan sehat
- e) Anatomi tampak normal

4.4.3.2 Kriteria eksklusi

- a) Terdapat kecacatan anatomis

4.4.4 Cara pengambilan sampel

Untuk menghindari bias karena variasi faktor umur dan berat badan maka pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*). Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel yang diambil dari mencit *balb/c* sudah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sehingga dianggap cukup homogen. Semuanya diambil secara acak dari kelompok mencit yang sudah diadaptasi pakan selama 1 minggu.

4.4.5 Besar sampel

Besar sampel mengacu pada pedoman WHO mengenai penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental. Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan minimal 5 ekor, oleh karena terdapat 4 kelompok maka diperlukan minimal 20 ekor mencit.

4.5 Variabel penelitian

4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *methanil yellow* peroral dosis bertingkat.

4.5.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologis hepar mencit *balb/c*.

4.6 Definisi operasional variabel

Tabel 2. Definisi operasional variabel

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
Bebas	<i>Methanil yellow</i> peroral dosis bertingkat	<i>Methanil yellow</i> peroral dosis bertingkat yang diberikan pada mencit <i>balb/c</i> sesuai kelompoknya. 0 ml/hari pada kelompok kontrol, 1x dosis subletal pada kelompok 1, 1/2x dosis letal pada kelompok 2, 1/4x dosis subletal pada kelompok 3. Volume <i>methanil yellow</i> dosis bertingkat diukur dengan spuit 1 cc (tuberculin). Setelah itu dicampur dengan akuades hingga 1 ml dan diberikan per sonde selama 30 hari. Dosis <i>methanil yellow</i> menyesuaikan perhitungan.	miligram	Rasio
Tergantung	Gambaran histopatologi hepar mencit Balb/c	Gambaran histopatologis hepar mencit <i>balb/c</i> dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada lima lapangan pandang.		Ordinal

4.7 Cara pengumpulan data

4.7.1 Bahan

Bahan-bahan untuk percobaan ini :

- 1) Mencit *balb/c* jantan
- 2) Asam pikrat
- 3) *Methanil yellow*
- 4) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan :
 - a) Larutan buffer formalin 10%
 - b) Paraffin
 - c) Albumin
 - d) Hematoksilin Eosin (HE)
 - e) Asam asetat
 - f) Larutan xylol
 - g) Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%
 - h) Akuades

4.7.2 Alat

4.7.2.1 Alat untuk memberikan perlakuan

- a) Kandang mencit *balb/c*
- b) Sonde
- c) Spuit 1 cc (tuberculin)

4.7.2.2 Alat untuk otopsi

- a) Skalpel
- b) Pinset *chirurgis*
- c) Gunting
- d) Botol kaca untuk menyimpan organ

4.7.2.3 Alat untuk pemeriksaan histopatologis

- a) Mikroskop cahaya
- b) *Object glass* dan *deck glass*
- c) Kamera digital

4.7.3 Jenis data

Data yang dikumpulkan merupakan data primer hasil penelitian gambaran histopatologis hepar mencit *balb/c* dari kelompok paparan *methanil yellow* peroral dosis bertingkat dan kelompok kontrol.

4.7.4 Cara kerja

- a) 20 ekor mencit *balb/c* yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang tunggal dan diberi pakan standar serta minum ad libitum.
- b) Pada hari ke-8, mencit *balb/c* dibagi menjadi 4 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit *balb/c* yang dipilih secara acak.

Kemudian diberi tanda dengan asam pikrat pada daerah yang berbeda yaitu kepala dan punggung.

- c) Masing-masing mencit ditimbang berat badannya.
- d) Mulai hari ke-8 selama 30 hari pada kelompok I diberikan *methanil yellow* dengan dosis 4200 mg/kgBB yang dicampur dalam air minum sampai 1 ml diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum ad libitum. Kelompok II diberikan *methanil yellow* dengan dosis 2100 mg/kgBB yang dicampur dalam air minum sampai 1 ml diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum ad libitum. Kelompok III diberikan *methanil yellow* dengan dosis 1050 mg/kgBB yang dicampur dalam air minum sampai 1 ml diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum ad libitum. Kelompok terakhir adalah kelompok kontrol diberikan pakan standar dan minum ad libitum.
- e) Setelah 30 hari masing-masing mencit ditimbang berat badannya.
- f) Mencit *balb/c* dimatikan dengan cara dislokasi leher.
- g) Organ hepar diambil. Sampel hepar tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet bufer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian ginjal dan 9 bagian bufer formalin 10 %.
- h) Tabung berisi sampel hepar mencit *balb/c* diletakkan ke rak tabung kemudian diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (*Lampiran 2*). Dari setiap sampel ginjal dibuat preparat dengan potongan koronal. Preparat

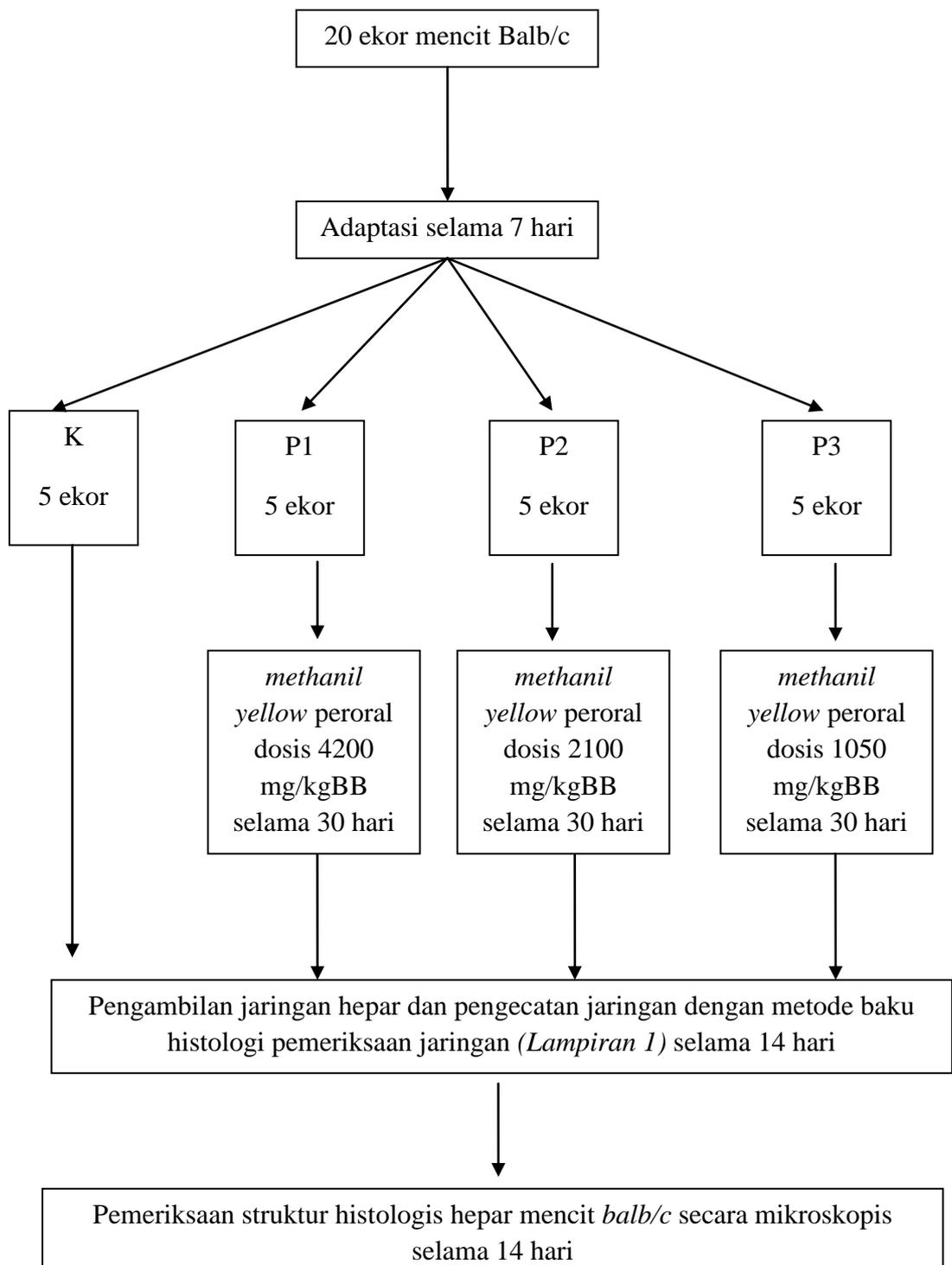
tersebut akan dibaca dalam lima lapangan pandang dengan perbesaran 400x. Sasaran yang dibaca adalah perubahan abnormal gambaran histopatologi pada ginjal yaitu degenerasi dan nekrosis.

- i) **Tabel 3.** Kriteria pembacaan derajat histopatologi hepar berdasarkan derajat histopatologi hepar berdasar Knodel score modifikasi

Intralobular Degeneration	Score	Portal Inflammation	Score
None	0	No portal inflammation	0
Mild (Acidophilic bodies, ballooning degeneration in one third of lobules or nodules)	1	Mild (sprinkling of inflammatory cells in less than one third of portal tract)	1
Moderate (Involvement of freather than two third of lobules or nodules)	3	Moderate (increased inflammatory cells in one thirds to two thirds of portal tracts)	3
Marked (involvement of greaterthan two thirds of lobules or nodules)	4	Marked (dense packing of inflammatory cells in greater than two thirds of lobules or	4

nodules)

4.8 Alur penelitian



Gambar 4. Skema alur penelitian

4.9 Analisis data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer SPSS 17.0 dan dilihat distribusi datanya normal atau tidak dengan uji *Shapiro-Wilk*. Bila distribusi datanya normal, varians datanya sama, diuji beda dengan menggunakan statistik parametrik *One Way Anova*, jika $P < 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Bila distribusi datanya tidak normal, atau varians data tidak sama, maka ditransformasi. Jika setelah ditransformasi tetap didapatkan distribusi data yang tidak normal atau tidak sama, maka dilakukan uji beda menggunakan statistik non parametrik *Kruskal-Wallis*, jika didapat $P < 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc (Mann Whitney test)*.³⁵

- a) Jika $P < 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna
- b) Jika $P > 0,05$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna

Jika didapatkan hasil yang berbeda bermakna, maka ada perbedaan yang bermakna gambaran histopatologis ginjal mencit *balb/c* pada pemberian *methanil yellow* peroral dosis bertingkat selama 30 hari.

Jika didapatkan hasil yang tidak berbeda bermakna, maka tidak ada perbedaan yang bermakna gambaran histopatologis ginjal mencit *balb/c* pada pemberian *methanil yellow* peroral dosis bertingkat selama 30 hari.

4.10 Etika penelitian

Ethical Clearence akan dimintakan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro sebelum penelitian dilakukan. Mencit balb/c dipelihara di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang (F-MIPA UNNES). Hewan diberi makan dan minum ad libitum. Untuk perlakuan, metanil yellow dosis bertingkat dicampur dengan air hingga 3ml kemudian disondekan. Hewan diterminasi dengan cara dekapitasi. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti.

4.11 Jadwal penelitian

Tabel 4. Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	Waktu (Bulan ke)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	Penyusunan proposal								
2	Seminar proposal penelitian								
3	Revisi proposal penelitian								
4	Pelaksanaan penelitian (pemilihan sampel, perlakuan, terminasi)								
5	Pengumpulan dan pengolahan data								
6	Penyusunan laporan hasil								
7	Seminar hasil penelitian								

