

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

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

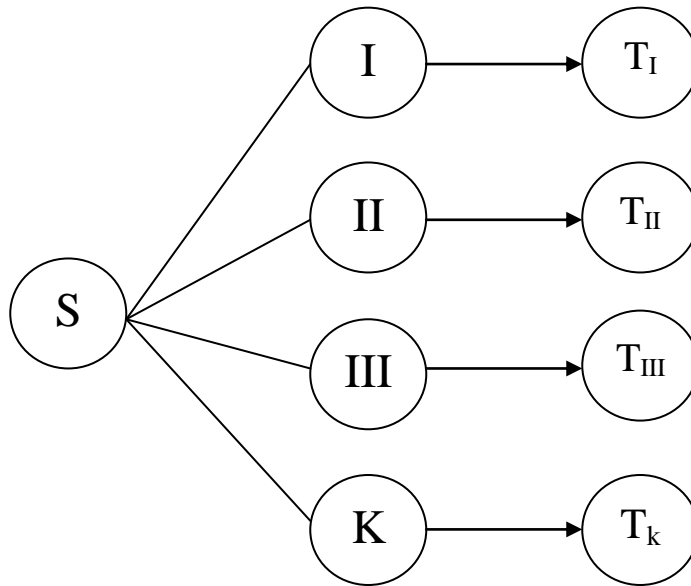
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 12 minggu, yaitu dimulai pada bulan Maret 2014 hingga Mei 2014. Mencit Balb/c diadaptasi selama satu minggu, kemudian diberikan metanil yellow dosis bertingkat yang dicampur dalam akuades selama 30 hari, terminasi dan pembuatan blok parafin sampai pengecatan jaringan dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang. Sedangkan interpretasi hasil mikroskopis sampel jaringan ginjal dilakukan di Laboratorium Histologi 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 8. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

S = Kelompok Sampel

I = Kelompok Perlakuan I (Metanil yellow peroral 84 mg/hari)

II = Kelompok Perlakuan II (Metanil yellow peroral 42 mg/hari)

III = Kelompok Perlakuan III (Metanil yellow peroral 21 mg/hari)

K = Kelompok Kontrol (Metanil yellow peroral 0 mg/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 yang 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 strain Balb/c
- b) Jantan
- c) Berat badan 20 - 25 gram
- d) Usia 2-3 bulan
- e) Mencit dalam keadaan sehat dan aktif

4.4.3.2 Kriteria Eksklusi

- a) Terdapat kelainan anatomi

4.4.4 Cara Pengambilan Sampel

Untuk menghindari bias karena variasi faktor umum 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 dosis bertingkat metanil yellow yang diberikan peroral.

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologis ginjal mencit Balb/c.

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4. Definisi Operasional

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
Bebas	Metanil yellow peroral dosis bertingkat	Metanil yellow peroral dosis bertingkat yang diberikan pada mencit Balb/c sesuai kelompoknya. 0 ml/hari pada kelompok kontrol, 1 x dosis sub letal pada kelompok 1 (4200 mg/kgBB), ½ x dosis sub letal pada kelompok 2 (2100 mg/kgBB), ¼ x dosis sub letal pada kelompok 3 (1050 mg/kgBB). Volume metanil yellow dosis bertingkat diukur dengan spuit 1 cc (tuberculin). Setelah itu dicampur dengan akuades hingga 1 ml dan diberikan per sonde selama 30 hari. Dosis metanil yellow telah disesuaikan dengan perhitungan (<i>Lampiran1</i>).	Miligram	Rasio
Tergantung	Gambaran histopatologis ginjal mencit Balb/c	Gambaran histopatologis ginjal mencit Balb/c dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada lima lapangan pandang. Gambaran histopatologis ginjal mencit Balb/c dinilai berdasarkan degenerasi dan nekrosis yang terjadi (Tabel 5).		Ordinal

Tabel 5. Kriteria Pembacaan Derajat Histopatologi Ginjal

Degenerasi	Skor	Nekrosis	Skor
< 25%	1	< 25%	1
25-<50%	2	25-<50%	2
50-<75%	3	50-<75%	3
75-100%	4	75-100%	4

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan Penelitian

- 1) Mencit Balb/c jantan
- 2) Metanil yellow
- 3) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan:
 - a) Larutan buffer formalin 10%
 - b) Hematoksin Eosin
 - c) Larutan xylol
 - d) Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%
 - e) Akuades

4.7.2 Alat Penelitian

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 operasi lurus tajam/tumpul
- 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 ginjal mencit Balb/c dari kelompok paparan metanil yellow peroral dosis bertingkat dan kelompok kontrol.

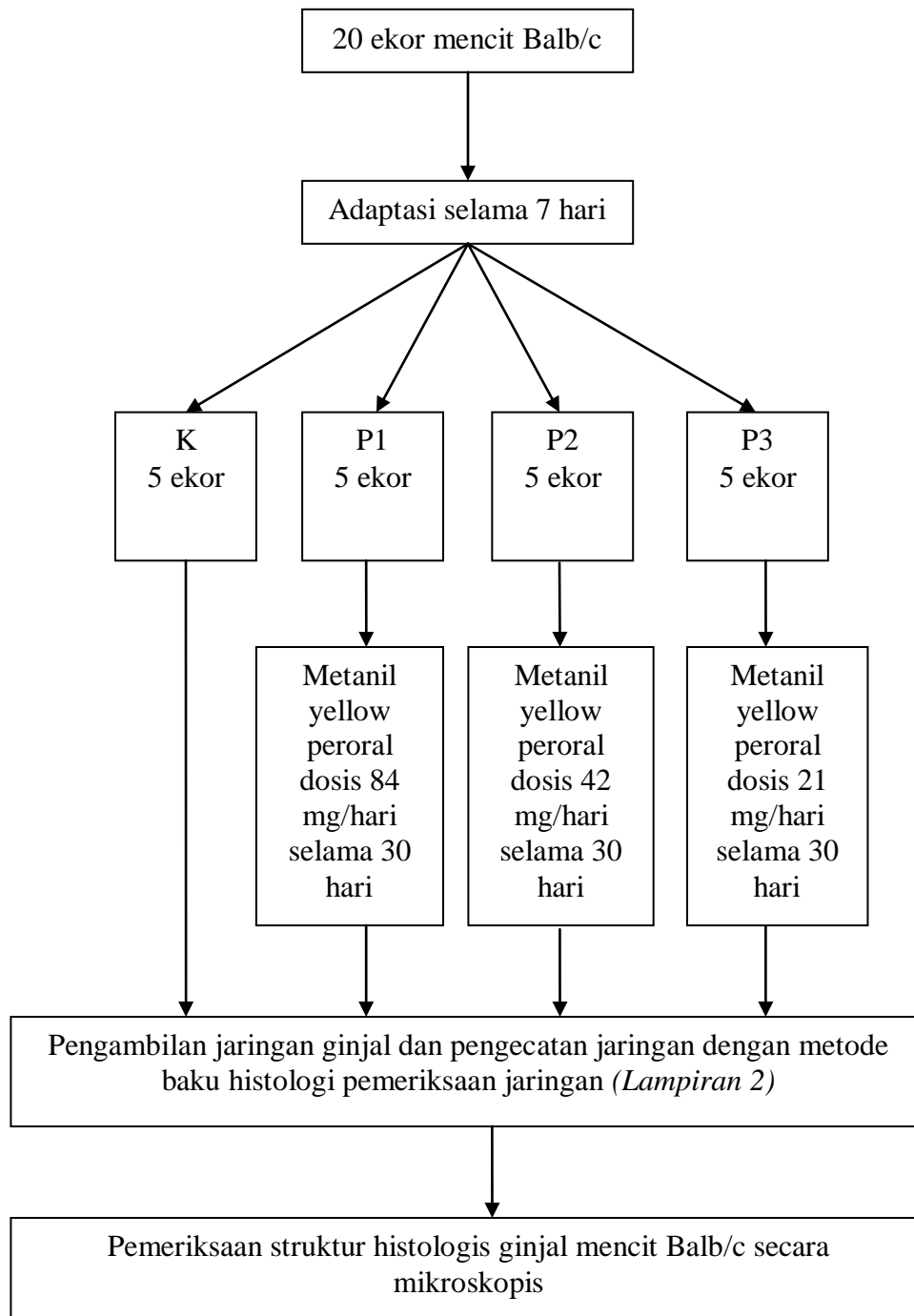
4.7.4 Cara Kerja

- a) Dua puluh 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.
- c) Menimbang berat badan masing-masing mencit.
- d) Mulai hari ke-8 selama 30 hari pada kelompok I diberikan metanil yellow dengan dosis 84 mg/hari yang dicampur dalam akuades sampai 1 ml diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok II diberikan metanil yellow dengan dosis 42 mg/hari yang di dicampur dalam akuades sampai 1 ml diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad*

libitum. Kelompok III diberikan metanil yellow dengan dosis 21 mg/hari yang dicampur dalam akuades sampai 1 ml diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*. Kelompok terakhir adalah kelompok kontrol yang diberikan akuades 1 ml dengan sonde, pakan standar dan minum *ad libitum*.

- e) Setelah 30 hari masing-masing mencit ditimbang berat badannya.
- f) Mencit Balb/c dimatikan (dekapitasi) dengan cara dislokasi leher.
- g) Mengambil organ ginjal kiri. Sampel ginjal tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet buffer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian ginjal dan 9 bagian buffer formalin 10%.
- h) Meletakkan tabung yang berisi sampel ginjal mencit Balb/c ke rak tabung, kemudian diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (*Lampiran 2*). Dari setiap sampel ginjal kiri dibuat preparat dan akan dibaca dalam lima lapangan pandang yaitu dari keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan pembesaran 400x. Pembacaan preparat dari lima lapangan pandang tersebut kemudian dicari rerata skor untuk penilaian satu mencit. Sasaran yang dibaca adalah perubahan abnormal gambaran histopatologi pada ginjal yaitu degenerasi dan nekrosis (Tabel 5).

4.8 Alur Penelitian



Gambar 9. Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

Jenis rancangan hipotesis yang digunakan pada penelitian ini adalah hipotesis komparatif numerik dengan lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan. Data yang diperoleh akan diolah dengan program komputer SPSS 21.0 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 $p \leq 0,05$ 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 $p \leq 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc (Mann Whitney test)*.^{33,34}

- a. Jika $p \leq 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna
- b. Jika $p > 0,005$; 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 metanil 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 metanil yellow peroral dosis bertingkat 30 hari.

4.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro telah diajukan sebelum penelitian dilakukan. Mencit Balb/c dipelihara di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang (FMIPA UNNES). Hewan diberi makan dan minum *ad libitum*. Untuk perlakuan, metanil yellow dosis bertingkat dicampur dengan akuades hingga 1 ml kemudian disondekan. Hewan diterminasi dengan cara dislokasi leher (dekapitasi). Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan (*Lampiran 2*). Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti.

4.11 Jadwal Penelitian

Tabel 6. 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								