

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

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

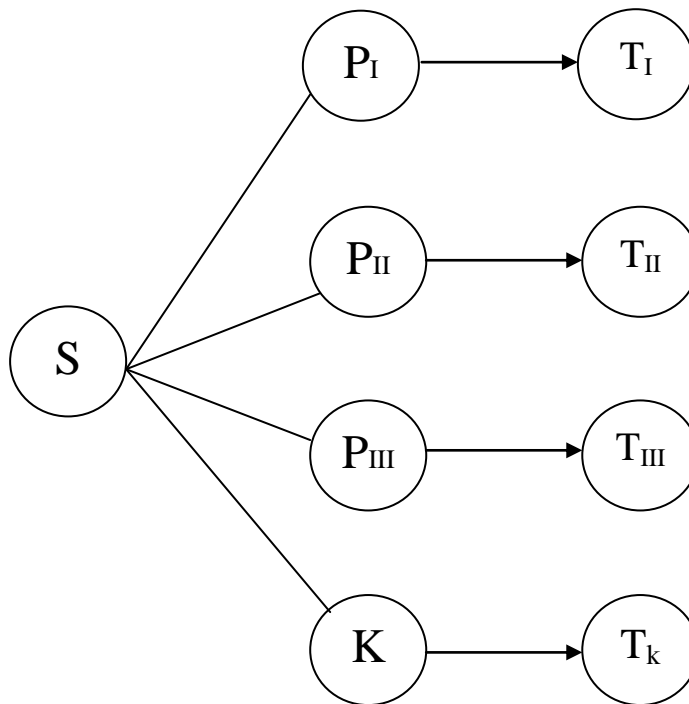
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan selama 12 minggu, yang dilakukan pada bulan Maret 2014 – Mei 2014. Mencit Balb/c diadaptasi selama satu minggu, kemudian diberikan *methanyl 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 duodenum 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 6. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

S = Kelompok Sampel

I = Kelompok Perlakuan I (*Methanyl yellow* peroral 1050 mg/kgBB/hari)

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

III = Kelompok Perlakuan III (*Methanyl yellow* peroral 4200 mg/kgBB/hari)

K = Kelompok Kontrol (Akuades secukupnya melalui penyondean)

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 galur murni, umur 3-4 bulan, berat badan 20-25 gram, sehat, tidak ada kelainan anatomi, dan 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 jantan galur murni
- b) Berat badan 20-25 gram
- c) Usia 3-4 bulan
- d) Mencit dalam keadaan sehat dan aktif
- e) Anatomi tampak normal

4.4.3.2 Kriteria eksklusi

- a) Mencit sakit dan terlihat tidak aktif
- b) Mencit mati sewaktu penelitian

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 *methanyl yellow* peroral dosis bertingkat.

4.5.2 Variabel tergantung

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

4.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 4. Definisi Operasional Variabel

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Nilai	Skala
Bebas	<i>Methanyl yellow</i> peroral dosis bertingkat	<i>Methanyl yellow</i> peroral dosis bertingkat yang diberikan pada mencit Balb/c sesuai kelompoknya. 0 ml/hari pada kelompok kontrol, 2x dosis letal pada kelompok 1, 1x dosis letal pada kelompok 2, 1/2x dosis letal pada kelompok 3. Volume <i>methanyl yellow</i> dosis bertingkat diukur dengan spuit 1 cc (tuberculin). Setelah itu dicampur dengan akuades hingga 3 ml dan diberikan per sonde selama 30 hari. Menurut penelitian dosis letal oral akut <i>methanyl yellow</i> pada mencit adalah 700 mg/kgBB.	1) Akuades secukupnya (berat badan antara 20-25 gram) 2) 4200 mg/kgBB (berat badan antara 20-25 gram) 3) 2100 mg/kgBB (berat badan antara 20-25 gram) 4) 1050 mg/kgBB (berat badan antara 20-25 gram)	Rasio
Tergantung	Gambaran histopatologis duodenum mencit Balb/c	Gambaran histopatologis duodenum mencit Balb/c dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada lima lapangan pandang.	Periportal±bridging necrosis, degenerasi intralobuler dan fokal nekrosis, inflamasi portal, serta fibrosis	Ordinal

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan

Bahan-bahan untuk percobaan ini :

- 1) Mencit Balb/c jantan
- 2) Asam pikrat
- 3) *Methanyl 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 ginjal mencit Balb/c dari kelompok paparan *methanyl yellow* peroral dosis bertingkat dan kelompok kontrol.

4.7.4 Cara kerja

- a) Melakukan proses adaptasi terhadap 20 ekor mencit balb/c jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang 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 mencit balb/c yang dipilih secara acak. Kemudian memberi tanda dengan asam pikrat pada daerah berbeda.
- c) Menimbang berat badan masing-masing mencit.

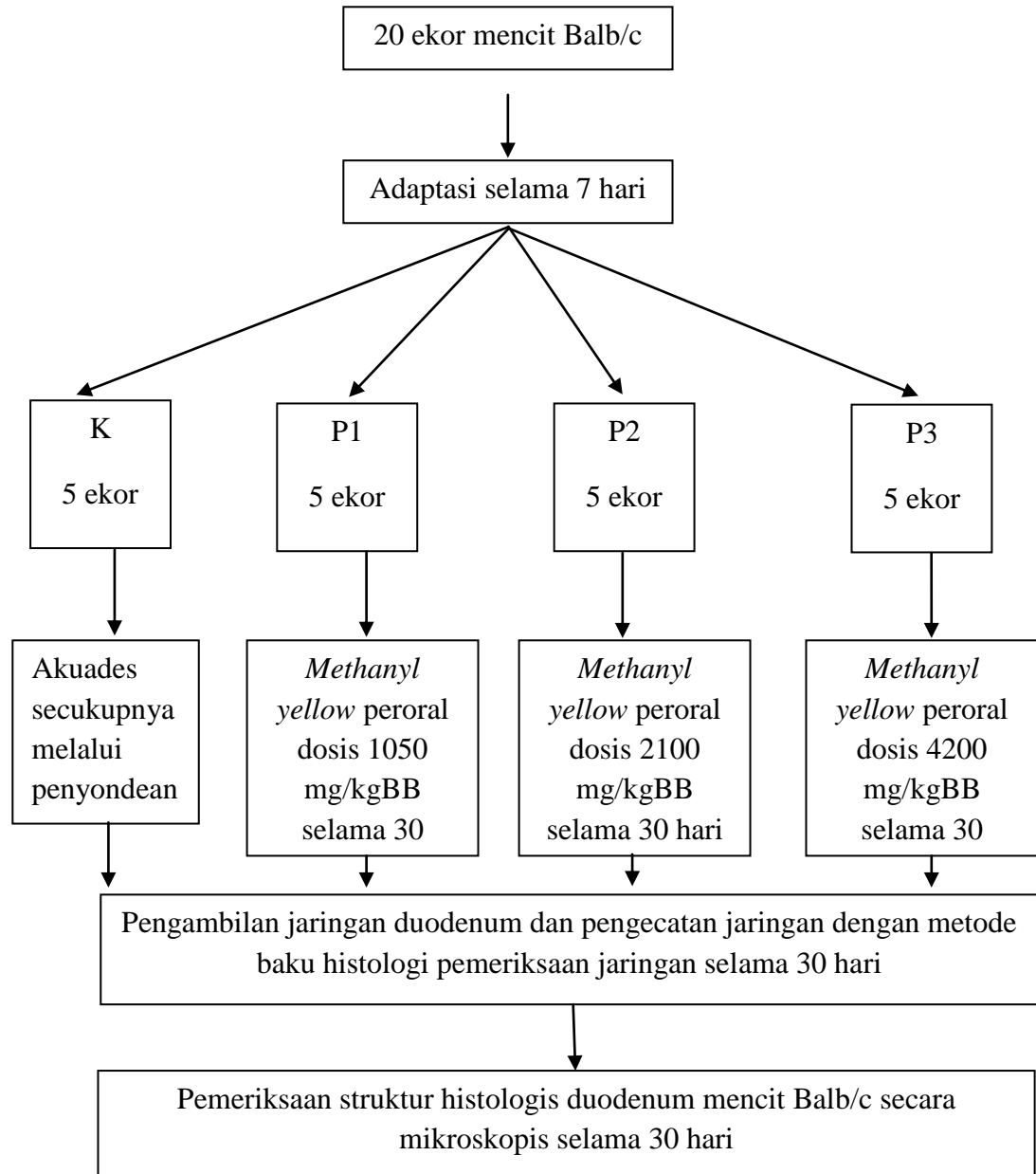
- d) Mulai hari ke-8 selama 30 hari pada kelompok I diberikan *methanyl yellow* dengan dosis 4200 mg/kgBB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standard an minum *ad libitum*. Kelompok II diberikan *methanyl yellow* dengan dosis 2100 mg/kgBB/hari yang di dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standar an minum *ad libitum*. Kelompok III diberikan *methanyl yellow* dengan dosis 1050 mg/kgBB/hari yang di dicampur dalam akuades sampai 3 ml diberikan dengan sonde, pakan standard an minum *ad libitum*.
- e) Setelah 30 hari masing-masing tikus ditimbang berat badannya
- f) Mencit balb/c dibunuh (dekapitasi) dengan cara dislokasi leher
- g) Mengambil organ duodenum. Sampel duodenum tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet 10% dengan perbandingan 1 bagian duodenum dan 9 bagian buffer formalin 10%
- h) Meletakkan tabung yang berisi sampel duodenum mencit balb/c ke rak tabung, kemudian menyerahkan ke analis guna mengolahnya mengikuti metode baku histologi (*Lampiran 1*). Dari setiap sampel duodenum dibuat preparat dengan potongan longitudinal. Preparat tersebut akan diukur tingkat kerusakan sel duodenum dengan rata-rata dari sistem skor berdasarkan modifikasi Barthel Manja. Tiap preparat dibaca dalam lima lapangan pandang yaitu dari keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan pembesaran 400x. Pembacaan preparat dari lima lapangan

pandang dicari rerata skor untuk penilaian satu mencit. Sasaran yang dibaca adalah perubahan struktur epitel mukosa duodenum tikus Balb/c yang diamati setiap lapangan pandang dengan penulain sebagai berikut :

Tabel 5. Skor Intergritas Mukosa Duodenum menurut Barthel Manja

Tingkat perubahan	Skor
Tidak ada perubahan	1
Desquamasi epitel	2
Erosi permukaan epitel (gap 1-10 sel epitel/lesi)	3
Ulserasi epitel	4

4.8 Alur Penelitian



Gambar 7. Alur penelitian

4.9 Analisa 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 duodenum mencit Balb/ pada pemberian *methanyl yellow* peroral dosis bertingkat selama 30 hari.

Jika didapatkan hasil yang tidak berbeda bermakna, maka tidak ada perbedaan yang bermakna gambaran histopatologis duodenum mencit Balb/ pada pemberian *methanyl 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, *methanyl 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 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								