

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

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

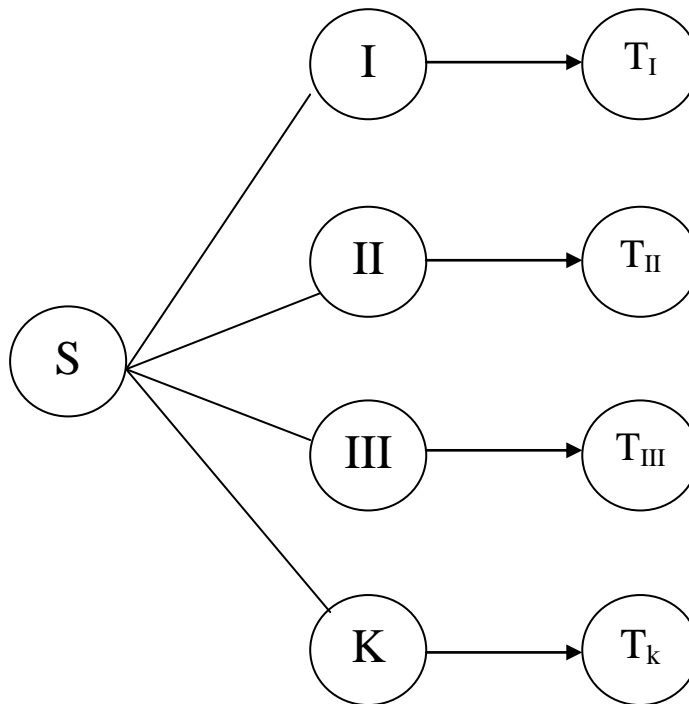
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan selama 12 minggu, yaitu dimulai pada bulan Maret 2014 – Mei 2014. Mencit balb/c diadaptasi selama satu minggu, kemudian diberikan metanil 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 esofagus 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 (Metanil yellow peroral 4200 mg/kgBB/hari)

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

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

K = Kelompok Kontrol (Aquadest)

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 2-3 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 2-3 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 metanil yellow peroral dosis bertingkat selama 30 hari.

4.5.2 Variabel tergantung

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

4.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 4. Definisi operasional variabel

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Nilai	Skala
Bebas	Metanil yellow peroral dosis bertingkat	Metanil yellow peroral dosis bertingkat yang diberikan pada mencit balb/c sesuai kelompoknya. Akuades pada kelompok kontrol, 1/4x dosis subletal pada kelompok 1, 1/2x dosis subletal pada kelompok 2, 1x dosis subletal pada kelompok 3. Volume metanil yellow dosis bertingkat diukur dengan spuit 1 cc (tuberculin). Setelah itu dicampur dengan akuades hingga 1 ml dan diberikan per sonda selama 30 hari. Menurut penelitian dosis subletal oral akut metanil yellow pada mencit adalah 3000 mg/kgBB.	1) akuades (berat badan antara 20-25 gram) 2) 1050 mg/kgB (berat badan antara 20-25 gram) 3) 2100 mg/kgB (berat badan antara 20-25 gram) 4) 4200 mg/kgB (berat badan antara 20-25 gram)	Rasio
Tergantung	Gambaran histopatologis esofagus	Gambaran histopatologis esofagus mencit balb/c dinilai setelah dilakukan pengecatan	1=normal 2=deskuamasi epitel	Interval

mencit balb/c	<p>Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada lima lapangan pandang. Gambaran histopatologis esofagus mencit balb/c dinilai berdasarkan modifikasi Barthel-Manja sebagai berikut:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Normal berarti tidak terdapat perubahan patologi. 2) Deskuamasi epitel berupa kerusakan ringan epitel, tanda adanya celah 3) Erosi permukaan epitel berupa celah pada satu sampai sepuluh epitel per lesi. 4) Ulserasi ditandai dengan adanya celah lebih dari sepuluh epitel per lesi, pada stadium ini biasanya terdapat jaringan granulasi dibawah epitel¹⁷ 	<p>3=erosi permukaan epitel</p> <p>4=ulserasi</p>
------------------	--	---

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan

Bahan-bahan untuk percobaan ini :

- 1) Mencit balb/c jantan
- 2) Asam pikrat
- 3) Metanil yellow
- 4) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan :
 - a) Larutan buffer formalin 10%
 - b) Paraffin
 - c) Albumin
 - d) Hematoksin 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) Sduit 1 cc (tuberkulin)

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 esofagus mencit balb/c dari kelompok paparan metanil yellow peroral dosis bertingkat dan kelompok kontrol.

4.7.4 Cara kerja

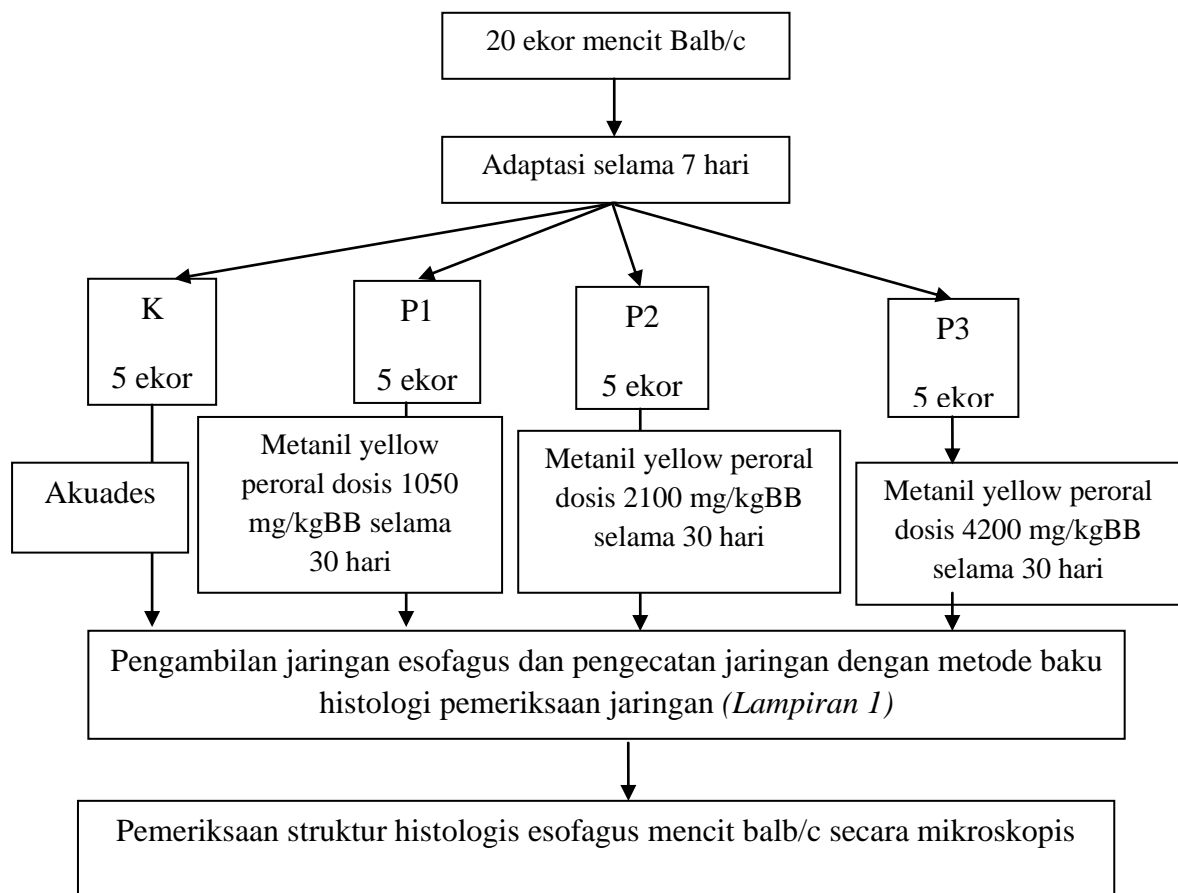
- a) 20 ekor mencit balb/c yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang tunggal dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*.
- b) Pada hari ke-8, mencit balb/c dibagi menjadi 4 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit balb/c yang 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 metanil yellow dengan dosis 1050 mg/kgBB yang dicampur dalam air minum sampai 1 ml diberikan dengan sonde, pakan standar dan minum ad libitum. Kelompok II diberikan metanil 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 metanil yellow dengan dosis 4200 mg/kgBB yang dicampur dalam air minum sampai 1 ml diberikan secara peroral 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 esofagus diambil, sampel esofagus tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet bufer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian esofagus dan 9 bagian bufer formalin 10%.
- h) Tabung berisi sampel esofagus mencit balb/c diletakkan ke rak tabung kemudian diserahkan ke analis untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin. Dari setiap sampel esofagus 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 esofagus.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4. 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)*.¹⁸

- 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 esofagus 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 esofagus mencit balb/c pada pemberian metanil yellow peroral dosis bertingkat selama 30 hari.

4.10 Etika Penelitian

Ethical Clearence 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 (FMIPA UNNES).

Hewan diberi makan dan minum ad libitum. Untuk perlakuan, metanil yellow dosis bertingkat dicampur dengan air hingga 1ml 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 5. Jadwal penelitian

	Kegiatan	Waktu (Bulan ke)							
	Penyusunan proposal	■	■						
	Seminar proposal penelitian		■						
	Revisi proposal penelitian		■						
	Pelaksanaan penelitian (pemilihan sampel, perlakuan, terminasi)			■	■	■			
	Pengumpulan dan pengolahan data					■			
	Penyusunan laporan hasil					■			
	Seminar hasil penelitian						■		