

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini mencakup bidang Histologi, Patologi Anatomi, dan Farmakologi

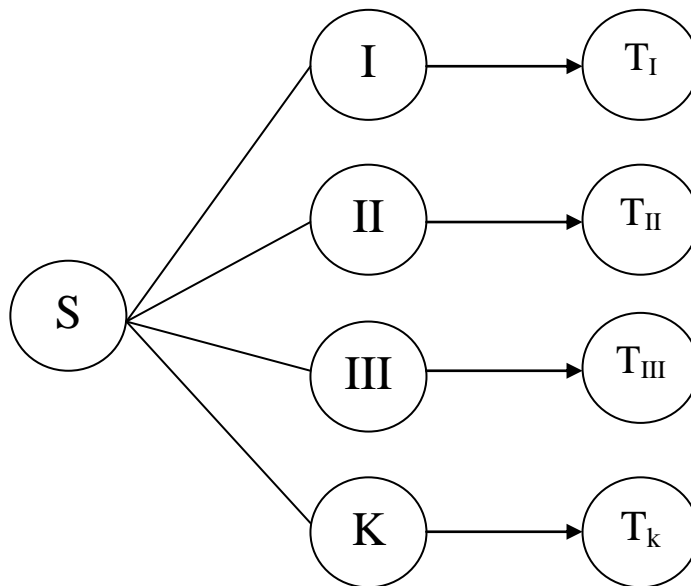
4.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian telah dilaksanakan selama 12 minggu, yaitu dimulai pada bulan maret 2014 hingga mei 2014. Pemeliharaan mencit balb/c sampai pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang. Sedangkan interpretasi hasil mikroskopis sampel gaster dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan pendekatan *The Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan mencit balb/c jantan sebagai objek penelitian.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



Gambar 9. 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 1050 mg/kgBB/hari)

K = Kelompok kontrol (Metanil 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

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) Umur 2-3 bulan
- b) Berat badan 20 - 25 gram

4.4.3.2 Kriteria eksklusi

Terdapat kecacatan anatomis

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 telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sehingga dianggap cukup homogen. Semuanya diambil secara acak yang sudah diadaptasi 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 dosis bertingkat.

4.5.2 Variabel tergantung

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

4.6 Definisi operasional

Tabel 4. Definisi operasional

Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
Metanil yellow dosis bertingkat	Metanil yellow peroral dosis bertingkat yang diperoleh dari hasil konversi tikus ke mencit yang akan diujikan pengaruhnya pada mencit balb/c. Diberikan sesuai kelompoknya. 1 x dosis subletal pada kelompok 1, ½ x dosis subletal pada kelompok 2, ¼ x dosis subletal pada kelompok 3, 0 ml/hari pada kelompok kontrol; Volume metanil yellow dosis bertingkat diukur menggunakan spuit 1cc (tuberculin). Setelah itu dicampur dengan akuades sampai 1 ml dan diberikan per sonde selama 30 hari. Dosis metanil yellow yang dapat menimbulkan lesi histopatologis pada tikus adalah 3000 mg/kgBB/hari	miligram	Rasio
Gambaran histopatologis gaster mencit balb/c	Untuk memeriksa gambaran histopatologis gaster mencit balb/c pada penelitian ini, diperoleh dengan cara membuat preparat gaster dengan menggunakan pengecatan Hematosilin Eosin (HE). Preparat tersebut diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x, diperiksa integritas mukosa. Tingkat kerusakan untuk satu mencit didapat dari rerata lima lapangan pandang.		Ordinal

4.7 Cara pengumpulan data

4.7.1 Bahan

Bahan-bahan untuk percobaan ini :

- 1) Mencit balb/c jantan
- 2) Metanil yellow
- 3) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan :
 - a) Larutan buffer formalin 10%
 - b) Hematoksilin Eosin
 - c) Larutan Xylol
 - d) Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%
 - e) 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) Scalpel
- 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 gaster mencit balb/c jantan dari kelompok paparan metanil yellow peroral dosis bertingkat dan kelompok kontrol.

4.7.4 Cara kerja

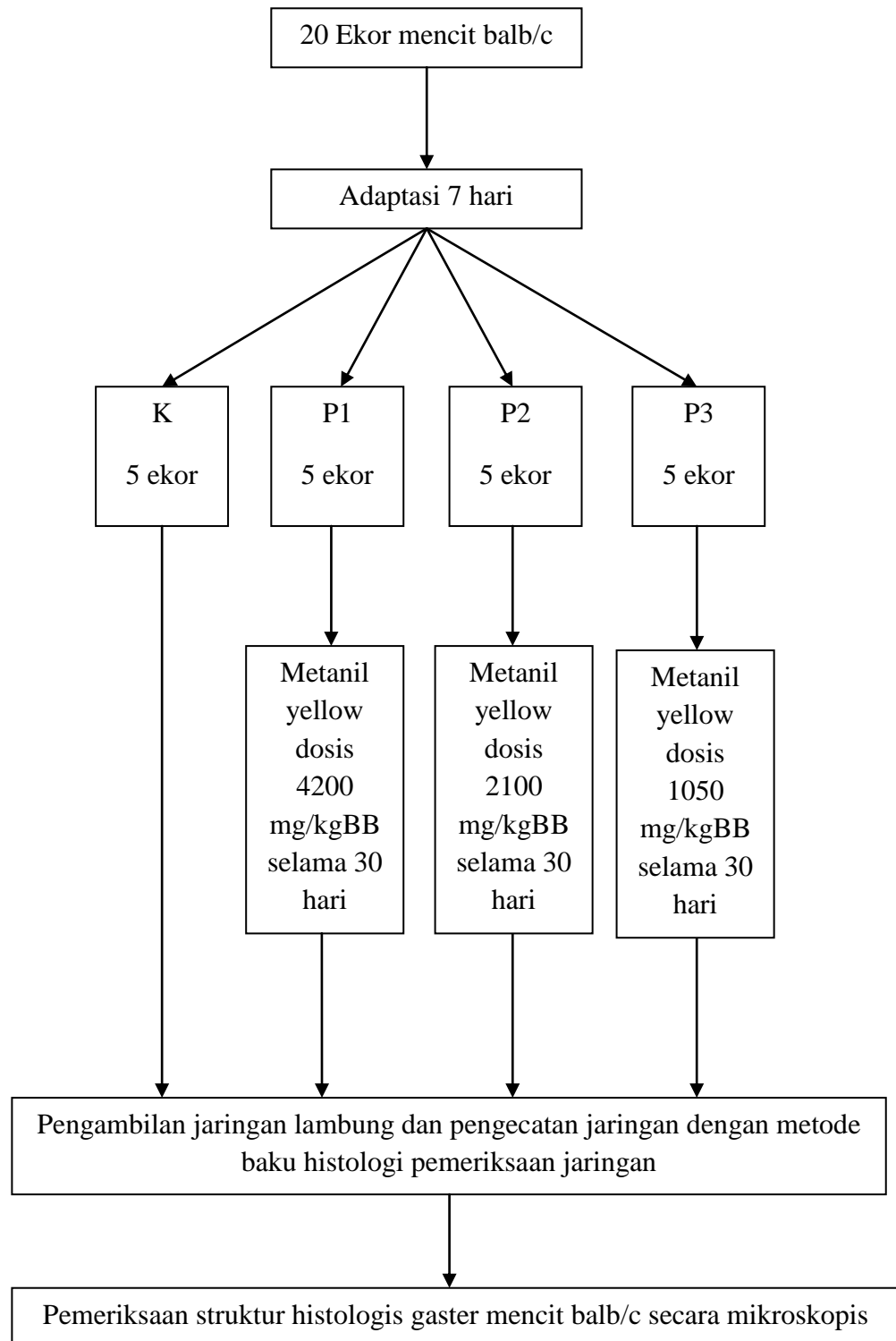
- a) Melakukan proses adaptasi terhadap 20 ekor mencit balb/c jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*
- b) Pada hari ke-8, mencit balb/c dibagi menjadi 4 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 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 metanil yellow dengan dosis 4200 mg/kgBB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 1 ml diberikan dengan sonde, pakan standard an minum *ad libitum*. Kelompok II diberikan metanil yellow dengan dosis 2100 mg/kgBB/hari yang di dicampur dalam akuades sampai 1 ml diberikan dengan sonde, pakan standar an minum *ad libitum*. Kelompok III

diberikan metanil yellow dengan dosis 1050 mg/kgBB/hari yang dicampur dalam akuades sampai 1 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 gaster. Sampel gaster tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet 10% dengan perbandingan 1 bagian gaster dan 9 bagian buffer formalin 10%
- h) Meletakkan tabung yang berisi sampel gaster mencit balb/c ke rak tabung, kemudian menyerahkan ke analis guna mengolahnnya mengikuti metode baku histologi (*Lampiran 2*). Dari setiap sampel gaster dibuat preparat dengan potongan longitudinal. Preparat tersebut akan diukur tingkat kerusakan sel gaster dengan rerata 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.
- i) Perhitungan skor berdasarkan modifikasi Barthel manja skor tingkat kerusakan yang diamati sebagai berikut:³²

Skor	Integritas Epitel Mukosa
0	Tidak ada perubahan patologis
1	Deskuamasi epitel
2	Erosi permukaan epitel (1-10 sel epitel/lesi)
3	Ulserasi epitel (>10 sel epitel/lesi)

4.8 Alur penelitian



Gambar 10. Alur penelitian

4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan program computer 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 *parametric 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 statistic *non-parametric Kruskal-Wallis*, jika didapat $p < 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc (Mann Whitney test)*

- a. Jika $p < 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna
- b. Jika $p > 0,005$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna

Jika didapatkan hasil yang berbeda dan bermakna, maka ada perbedaan bermakna gambaran histopatologik gaster mencit balb/c pada pemberian metanil yellow dosis bertingkat selama 30 hari.

Sebaliknya jika didapatkan hasil yang tidak bermakna, maka tidak ada perbedaan yang bermakna gambaran histopatologis gater mencit balb/c pada pemberian metanil yellow peroral dosis bertingkat 30 hari.

4.10 Etika penelitian

Ethical Clearence dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro telah diajukan sebelum penelitian. 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 kemudian disondekan. Hewan diterminasi dengan cara dislokasi leher. Pembuatan preparat sesuai dengan metode buku histopatologis pemeriksaan jaringan. Seluruh yang berkaitan dengan penelitian ditanggung oleh peneliti.

4.11 Jadwal penelitian

Tabel 5. 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								