

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup keilmuan penelitian ini adalah bidang Obstetri dan Ginekologi, Histologi, dan Farmakologi.

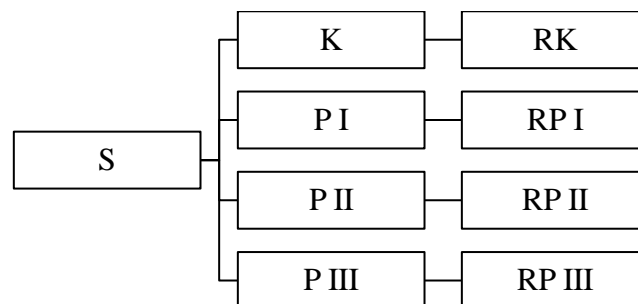
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

- a. Pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro (FK UNDIP).
- b. Pewarnaan rangka fetus hewan coba, pembuatan, serta pengamatan preparat dilakukan di Laboratorium Struktur dan Perkembangan Hewan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada (UGM).
- c. Penelitian ini dilaksanakan mulai pada bulan April hingga Juni 2016.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *true eksperimental* dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan hewan coba berupa mencit betina Balb/c yang berada dalam periode gestasi sebagai sampel penelitian.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



Gambar 11. Skema rancangan penelitian

Keterangan:

- S : Sampel keseluruhan
- K : Kelompok kontrol
- P I : Kelompok perlakuan I (pemberian ekstrak kunyit asam secara oral dengan dosis 1.365 mg/kgBB/hari)
- P II : Kelompok perlakuan II (pemberian ekstrak kunyit asam secara oral dengan dosis 4.095 mg/kgBB/hari)
- P III : Kelompok perlakuan III (pemberian ekstrak kunyit asam secara oral dengan dosis 12.285 mg/kgBB/hari)
- RK : Pertumbuhan dan perkembangan skeleton fetus pada kontrol
- RP I : Pertumbuhan dan perkembangan skeleton fetus pada kelompok perlakuan I
- RP II : Pertumbuhan dan perkembangan skeleton fetus pada kelompok perlakuan II
- RP III : Pertumbuhan dan perkembangan skeleton fetus pada kelompok perlakuan III

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah mencit Balb/c, umur 2-3 bulan, berat badan 20-35 gram, sehat, tidak ada kelainan morfologi, dan dipelihara di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro (FK UNDIP).

3.4.2 Sampel

3.4.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Mencit betina Balb/c
- b. Mencit dalam periode gestasi
- c. Berat badan 20-35 gram
- d. Usia 2-3 bulan
- e. Mencit dalam keadaan sehat dan aktif
- f. Tidak ada kelainan morfologi

3.4.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Terdapat kecacatan morfologi selama penelitian
- b. Mencit mati selama adaptasi dan perlakuan

3.4.3 Cara Pengambilan Sampel

Untuk menghindari bias karena variasi faktor umur dan berat badan maka pengambilan sampel dilakukan secara acak (*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 7 hari.

3.4.4 Besar Sampel

Besar sampel mengacu pada pedoman WHO mengenai penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental. Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor. Untuk menghindari *drop out* pada sampel, ditambahkan 10% sehingga jumlah sampel menjadi 6 ekor tiap kelompok. Oleh karena terdapat 4 kelompok (1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan), maka diperlukan 24 ekor mencit Balb/c.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak kunyit asam (*Curcuma domestica-Tamarindus indica*) secara oral dengan dosis bertingkat.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan dan perkembangan skeleton fetus mencit Balb/c dalam periode gestasi.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional variabel

Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
Ekstrak kunyit asam (<i>Curcuma domestica-indica</i>) dengan dosis bertingkat	Ekstrak kombinasi dari rimpang kunyit (<i>Curcuma domestica</i>) dan daging buah asam jawa (<i>Tamarindus indica</i>) dengan dosis bertingkat yang diberikan secara oral selama 10 hari, yakni pada hari ke-8-17 kebuntingan (masa organogenesis). Pada kelompok kontrol diberi aquades, sedangkan pada kelompok perlakuan (P) diberi ekstrak kunyit asam dengan dosis, sebagai berikut: - P I : 1.365 mg/kgBB/hari - P II : 4.095 mg/kgBB/hari - P III : 12.285 mg/kgBB/hari.	mg	Rasio
Jumlah komponen skeleton fetus	Jumlah komponen kerangka tulang yang diamati meliputi komponen kerangka aksial dan kerangka appendikular. - Rangka aksial meliputi: 1. <i>vertebrae</i> (7 ruas tulang <i>cervical</i> , 13 ruas tulang <i>thoracal</i> , 6 ruas tulang <i>lumbal</i> , dan 4 ruas tulang <i>sacral</i>)	Ruas	Rasio

2. *costae* (terdiri dari 13 ruas)

3. *sternum* (terdiri dari 6 ruas).

- Rangka appendikular meliputi:

1. *ekstremitas anterior* (*carpal*), yang terdiri dari 4 ruas *metacarpal*, 4 ruas *phalanx proksimal*, dan 5 ruas *phalanx distal*.

2. *ekstremitas posterior* (*tarsal*), yang terdiri dari 5 ruas *metatarsal*, 4 ruas *phalanx proksimal*, dan 5 ruas *phalanx distal*.

Rasio Osifikasi Tulang Panjang pada <i>Ekstremitas Anterior</i> dan <i>Ekstremitas Posterior</i>	Tingkat osifikasi tulang panjang pada <i>ekstremitas</i> dengan cara mengukur panjang tulang seluruhnya dibandingkan dengan tulang yang telah mengalami osifikasi sempurna (warna merah pada tulang panjang tersebut) dengan pengukuran kalibrasi menggunakan aplikasi Coreldraw.	Rasio
	Tulang panjang yang diamati yaitu pada <i>ekstremitas anterior</i> meliputi <i>humerus</i> , <i>radius</i> , dan <i>ulna</i> , serta <i>ekstremitas posterior</i> meliputi <i>femur</i> , <i>tibia</i> , dan <i>fibula</i> .	

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

- a. Bahan untuk pembuatan ekstrak kunyit asam, yaitu rimpang kunyit, daging buah asam jawa, dan aquades.
- b. Bahan untuk perlakuan, yaitu *pellet Par G* sebagai pakan sehari-hari, ekstrak kunyit asam, dan aquades.
- c. Bahan kimia untuk pembuatan preparat *wholemout* fetus, yaitu etanol 96%, aseton, zat warna *Alizarin Red-Alcian Blue*, gliserin murni, aquades, dan KOH.

3.7.2 Alat

- a. Alat untuk perlakuan, yaitu kandang untuk pemeliharaan mencit beserta tempat minum, bak perkawinan, neraca O Hauss, spuit 1 cc, dan sonde.
- b. Alat untuk otopsi, yaitu botol kaca untuk penyimpanan fetus, *scalpel*, pinset *chirurgis*, dan gunting operasi lurus tajam/tumpul.
- c. Alat untuk pembuatan preparat *wholemout* fetus, yaitu botol kaca besar bertutup dan tidak bertutup, serta gelas ukur.
- d. Alat untuk pengamatan preparat, yaitu kertas milimeter blok, lampu, cawan patri, dan lup.
- e. Alat untuk dokumentasi, yaitu kamera digital.

3.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan merupakan data primer hasil penelitian pertumbuhan dan perkembangan skeleton fetus mencit betina Balb/c dalam

periode gestasi dari kelompok paparan ekstrak kunyit asam (*Curcuma domestica-Tamarindus indica*) yang diberikan secara oral dengan dosis bertingkat dan kelompok kontrol.

3.7.4 Cara Kerja

a. Persiapan hewan coba

1. Mencit betina Balb/c dalam periode gestasi yang berusia 2-3 bulan dengan berat sekitar 20-35 gram dipelihara dalam kandang, masing-masing kandang perlakuan berisi 6 ekor mencit.
2. Mencit betina Balb/c sebelum digunakan untuk penelitian diadaptasi dahulu selama 7 hari dan diberi makan dan minum secara *ad libitum*.
3. Mencit betina yang sedang dalam masa estrus dikandangkan bersama mencit jantan dalam bak perkawinan pada sore hari agar terjadi perkawinan. Jika keesokan harinya ditemukan sumbat vagina (*vaginal plug*) atau sisa sperma dalam vagina, maka esok harinya ditentukan sebagai hari pertama kebuntingan.

b. Perlakuan hewan coba

Mencit betina yang berhasil bunting dibagi dalam 4 kelompok, 1 kelompok merupakan kelompok kontrol dan 3 kelompok merupakan kelompok perlakuan, masing-masing ada 6 ekor mencit. Semua mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Pada kelompok kontrol diberi aquades, sedangkan kelompok perlakuan diberi larutan

ekstrak kunyit asam (*Curcuma domestica-Tamarindus indica*). Dosis per cekokan masing-masing kelompok perlakuan sebagai berikut :

- a. Perlakuan I : dosis ekstrak kunyit asam 1.365 mg/kgBB/hari.
- b. Perlakuan II : dosis ekstrak kunyit asam 4.095 mg/kgBB/hari.
- c. Perlakuan III : dosis ekstrak kunyit asam 12.285 mg/kgBB/hari.

c. Pemberian ekstrak kunyit asam

Pemberian ekstrak kunyit asam (*Curcuma domestica-Tamarindus indica*) secara oral menggunakan sonde pada hari ke-8 sampai ke-17 kebuntingan (masa organogenesis), kemudian pada hari ke-18 mencit dibedah.

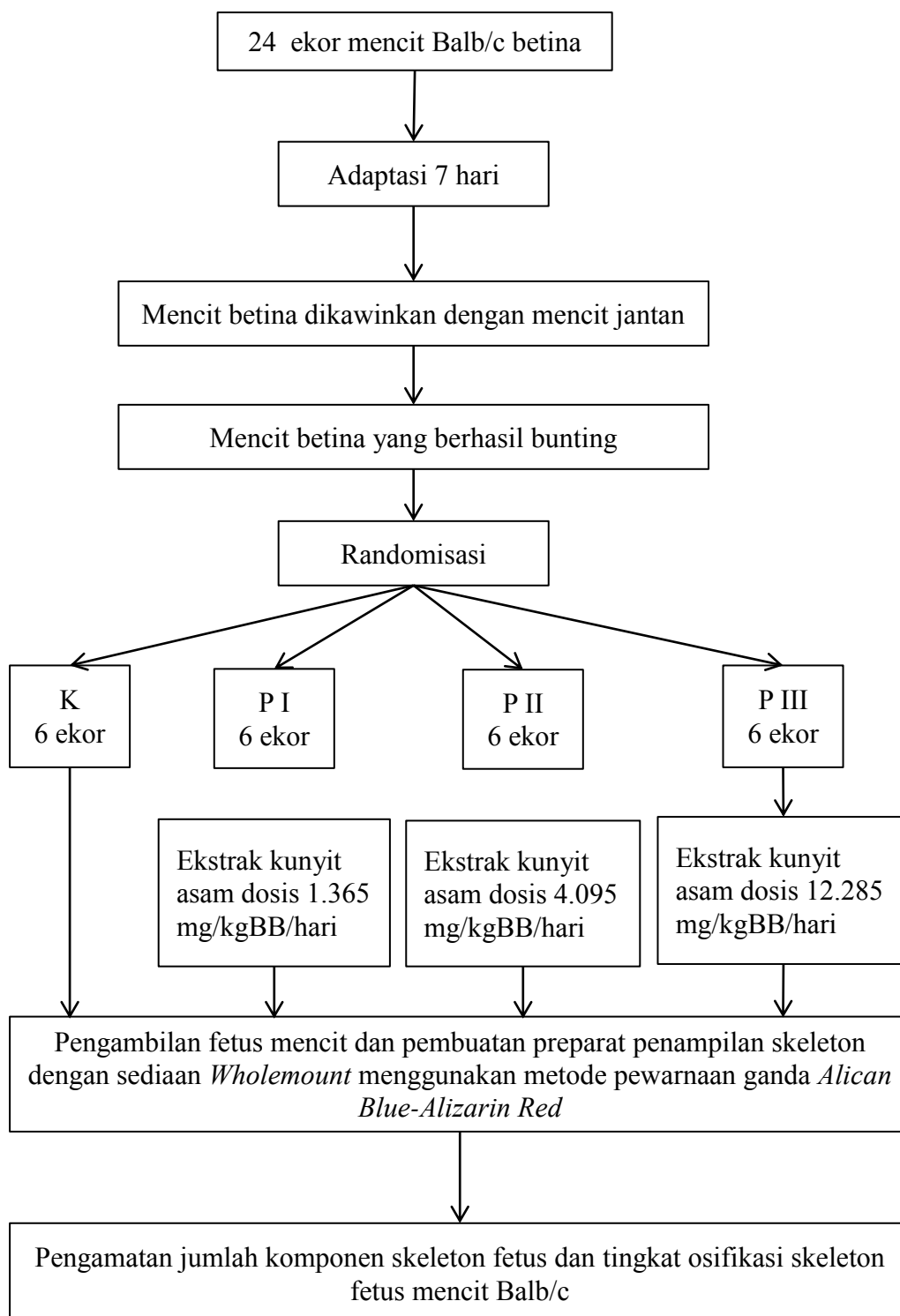
d. Pembedahan dan pengamatan

Pada hari ke-18 kebuntingan, hewan coba diterminasi dengan cara dianestesi dengan *ether* terlebih dahulu lalu didislokasi leher mencit, selanjutnya dilakukan pembedahan sesar untuk diambil fetusnya, kemudian dilakukan pengamatan pertumbuhan dan perkembangan skeleton fetus mencit meliputi jumlah komponen skeleton dan tingkat osifikasi komponen tulang panjang. Pengamatan bentuk fetus dibuat preparat *wholemout* dengan metode pewarnaan ganda *Alcian Blue-Alizarin Red* menurut Inouye (1976).

e. Pemotretan Fetus

Abnormalitas sistem skeleton fetus mencit diamati, kemudian dilakukan pemotretan dengan menggunakan kamera foto digital.

3.8 Skema Alur Penelitian



Gambar 12. Bagan alur penelitian

3.9 Analisa Data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer *SPSS for windows*. Data penampilan dan perkembangan skeleton fetus mencit Balb/c dalam periode gestasi dilihat distribusi datanya normal atau tidak (uji normalitas) menggunakan uji *Shapiro-Wilk* ($p > 0,05$). Bila distribusi data normal dan varians datanya sama, dilanjutkan dengan uji beda menggunakan statistik parametrik *One Way Anova*, kemudian jika terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan analisa *Post Hoc*. Bila distribusi datanya tidak normal atau varians data tidak sama, maka ditransformasi. Jika setelah ditransformasikan tetap didapatkan distribusi data yang tidak normal atau tidak sama, maka dilakukan uji beda menggunakan statistik non parametrik *Kruskall-Wallis*, jika didapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan analisa *Post Hoc (Mann Whitney Test)*.³⁸

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

Jika didapatkan hasil yang bermakna, maka diinterpretasikan dengan terdapat perbedaan yang bermakna terhadap pertumbuhan dan perkembangan skeleton fetus mencit Balb/c pada pemberian secara oral ekstrak kunyit asam (*Curcuma domestica-Tamarindus indica*) dengan dosis bertingkat.

Jika didapatkan hasil yang tidak bermakna, maka diinterpretasikan dengan tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap pertumbuhan dan perkembangan skeleton fetus mencit Balb/c pada pemberian secara oral

ekstrak kunyit asam (*Curcuma domestica-Tamarindus indica*) dengan dosis bertingkat.

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro (KEPK FK UNDIP) No. 486/EC/FK-RSDK/2016. Mencit betina Balb/c dipelihara di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro (FK UNDIP). Intervensi dilakukan dengan memberikan ekstrak kunyit asam (*Curcuma domestica-Tamarindus indica*) secara oral menggunakan sonde. Hewan diterminasi dengan cara dianestesi dengan *ether* terlebih dahulu lalu didislokasi leher mencit, selanjutnya dilakukan laparatomy untuk diambil fetusnya, lalu dilakukan pengamatan pertumbuhan dan perkembangan skeleton fetus mencit meliputi jumlah komponen skeleton dan tingkat osifikasi tulang. Pengamatan bentuk fetus dibuat preparat *wholemout* dengan metode pewarnaan ganda *Alcian Blue-Alizarin Red* menurut Inouye (1976), dilakukan secara subjektif berdasarkan mata pengamat menggunakan alat bantu lup.

