

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup

Ruang lingkup penelitian ini adalah meliputi bidang keilmuan Telinga Hidung Tenggorok- Kepala Leher , Patologi Anatomi, dan Farmakologi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

- a. Pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.
- b. Pembuatan preparat dan menghitung jumlah eosinofil pada hewan coba dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- c. Penelitian dan pengumpulan data pada bulan Maret – Juni 2016.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

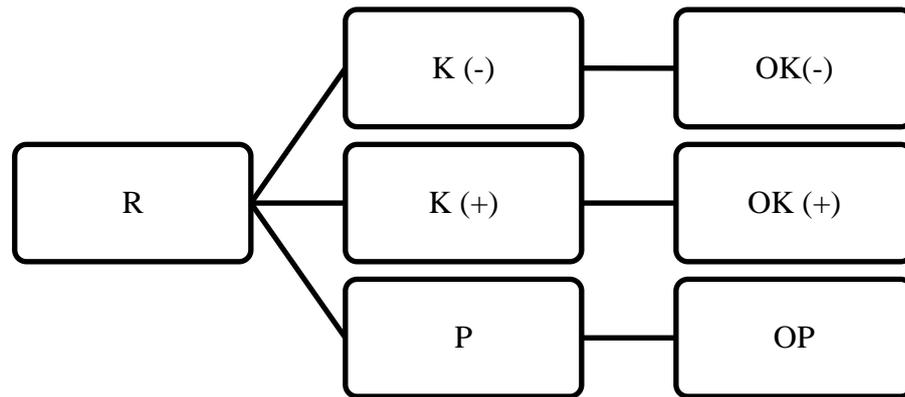
3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Karena pada penelitian ini nantinya akan diberikan intervensi berupa vitamin D pada mencit Balb/c yang diinduksi ovalbumin.

3.3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni yang didesain menggunakan desain *Post Test Only Control Group Design*. Objek

yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit *Balb/c* yang berjenis kelamin betina dengan berat mencit rata – rata 20-25 gram dan umur mencit adalah 6-12 minggu. Penelitian dilakukan dengan menganalisis hasil pengamatan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.



Gambar 5. Skema Desain Penelitian.

Keterangan:

R : Randomisasi

K (-) : Kelompok kontrol mencit Balb/c dengan pakan standar

K (+) : Kelompok kontrol mencit yang diinduksi ovalbumin

P : Kelompok perlakuan mencit yang diinduksi ovalbumin dan diberi suplemen vitamin D

OK(-) : Pengamatan pada kelompok kontrol negatif.

OK(+): Pengamatan pada kelompok kontrol positif.

OP : Pengamatan pada kelompok perlakuan.

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Target

Populasi target pada penelitian ini adalah mencit *Balb/c* yang memenuhi kriteria inklusi.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah mencit *Balb/c* yang ada di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.

3.4.3 Sampel

3.4.3.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mencit *Balb/c* betina.
2. Usia 6-12 minggu.
3. Berat badan 20-25 gram.
4. Kondisi sehat (aktif dan tidak cacat).

3.4.3.2 Kriteria Eksklusi

Terdapat kecacatan anatomis selama penelitian

3.4.3.3 kriteria Drop out

Mati selama adaptasi dan perlakuan

3.4.3.4 Cara Sampling

Sampel diambil dengan cara *simple random sampling* atau randomisasi sederhana, dimana semua objek yaitu mencit *Balb/c* mempunyai kesempatan yang sama untuk dijadikan sampel. Pengelompokan dilakukan secara acak setelah 7 hari mencit diadaptasi di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.

3.4.3.5 Besar Sampel

Berdasarkan ketentuan WHO untuk penelitian menggunakan herbal, besar sampel minimal tiap kelompok adalah 5 ekor mencit dengan cadangan 10%. Pada penelitian ini terdapat 2 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol. Besar sampel yang digunakan adalah 6 ekor mencit sehingga jumlah sampel seluruhnya adalah 18 ekor mencit.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian suplemen vitamin D.

3.5.2 Variabel Tergantung

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah eosinofil pada jaringan paru mencit *Balb/c* yang diinduksi ovalbumin.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala
Suplemen vitamin D secara per oral.	Suplemen vitamin D (IU) secara oral dengan sonde lambung dari hari ke-15 sampai ke-30.	Nominal
jumlah eosinofil pada jaringan paru mencit <i>Balb/c</i> yang diinduksi ovalbumin	Gambaran histopatologi jumlah eosinofil jaringan paru mencit <i>Balb/c</i> diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali.	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan dan Alat

3.7.1.1 Bahan

1. Mencit *Balb/c*
2. Suplemen vitamin D
3. Ovalbumin
4. Bahan-bahan untuk metode baku histopatologi pemeriksaan jaringan:
 - Larutan buffer formalin 10%
 - Parafin
 - Albumin
 - Hematoxyllin Eosin
 - Larutan Xylol

- Aquadest
- Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 96%

3. Pakan dan minum standar.

3.7.1.2 Alat

1. Kandang mencit *Balb/c*
2. Sonde lambung
3. Alat untuk mengambil organ (minor set)
4. Alat untuk membuat preparat histologi (mikrotom, oven, cetakan parafin)
5. Alat untuk melihat preparat histologi paru (deck glass, object glass, mikroskop cahaya)

3.7.2 Jenis Data

Data yang diambil adalah data primer yaitu dari pembacaan histopatologi jumlah eosinofil jaringan paru dari kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol mencit *Balb/c*.

3.7.3 Cara Kerja

3.7.3.1 Persiapan Dosis

- Dosis ovalbumin

Dosis intraperitoneal = 0,2 ml suspensi salin yang berisi 10 μ g ovalbumin (OVA) dan 2 mg aluminium hidrosida.

Dosis inhalasi = ovalbumin 1 % inhalasi

- Dosis suplemen vitamin D:

Mencit : Manusia = 20 gram : 70 kg

Dosis harian = 600 IU = 0,015 mg vitamin D

Mencit 20 gram = $0,015 \times 0,0026 = 0,000039$ mg vitamin D

= 1,56 IU

3.7.3.2 Cara Kerja

1. Sampel diadaptasi selama 7 hari di Laboratorium dan diberi pakan standar.
2. Dilakukan pengelompokan secara randomisasi, 18 ekor mencit *Balb/c* dibagi dalam 3 kelompok.
3. Kelompok kontrol yang diberi pakan standar selama 30 hari
4. Kelompok perlakuan pertama pada hari ke-0, ke-7 dan hari ke-14 diinduksi ovalbumin dengan injeksi intraperitoneal. Hari ke-19 sampai hari ke-21 diinhalasi ovalbumin intranasal dengan menggunakan nebulizer selama 30 menit dalam sehari.
5. Kelompok perlakuan pertama pada hari ke-0, ke-7 dan hari ke-14 diinduksi ovalbumin dengan injeksi intraperitoneal. Hari ke-19 sampai hari ke-21 diinhalasi ovalbumin intranasal dengan menggunakan nebulizer selama 30 menit dalam sehari. Dan diberi suplemen vitamin D secara oral dengan dosis 1,56 IU dari hari ke-15 sampai hari ke-30.
6. Semua kelompok hewan coba dilakukan terminasi pada hari ke-31. Kemudian dilakukan pembedahan, pembuatan dan pemeriksaan preparat

histopatologi jumlah eosinofil paru dari mencit *Balb/c* diproses secara mikroteknik dan dilakukan pengecatan

7. Masing-masing preparat dibaca dengan mikroskop mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali.

3.7.3.3 Pembuatan Preparat Histopatologi Paru

1. Metode dislokasi sendi atlantooccipital dipilih sebagai metode terminasi pada mencit
2. Mencit direbahkan dorsal dan ekstremitas difiksasi dengan jarum
3. Ruang peritoneum dibuka dengan insisi pada abdomen
4. Ruang dada dibuka dengan memotong tulang rusuk pada bagian sternum mencit
5. Organ paru dikeluarkan dan dibersihkan dengan larutan normal saline
6. Organ paru direndam di larutan buffer formalin 10% selama 24 jam dan di benamkan dalam parafin yang dicairkan dan dibuat blok parafin
7. Blok parafin dipotong tipis untuk dibuat slide dengan ketebalan 5 μ m dan dicat menggunakan pengecatan Hematoxylin-eosin (HE)

3.7.3.4 Pengecatan Preparat Histopatologi Paru

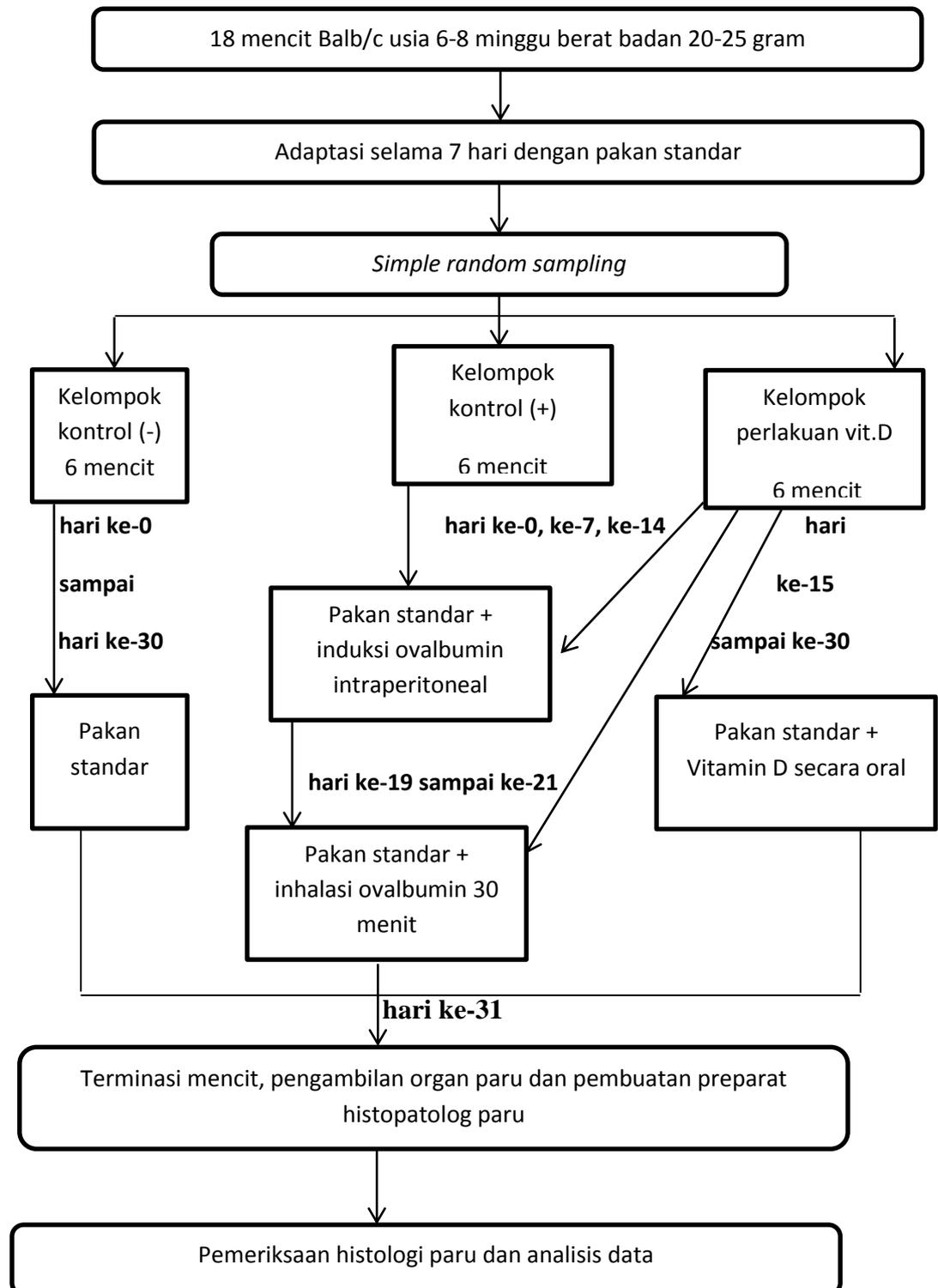
1. Memasukkan preparat ke Xylol I, II, dan III masing-masing 3 menit untuk melarutkan/melepaskan paraffin yang melekat pada preparat, setelah itu dilap pinggir jaringan dengan kain kasa
2. Memasukkan preparat ke alkohol 100%, 95%, 80%, 70% masing-masing 2 menit untuk menghilangkan xylol yang terbawa

3. Mengaliri dengan air mengalir 3 menit untuk menghilangkan sisa alkohol pada preparat
4. Memasukkan preparat ke dalam hematoksin 7 menit
5. Memasukkan preparat ke dalam larutan eosin 7 kali celup
6. Memasukkan preparat ke dalam alkohol 70 %, 80%, 95%, 100% 3 kali celup untuk dehidrasi
8. Memasukkan preparat ke Xylol I dan II masing-masing 2 menit untuk melepaskan sisa alkohol, setelah itu dilap dengan kain kasa sekitar jaringan dan tunggu sampai kering
9. Preparat diberi 1 tetes entelan dan ditutup objek glass

3.7.3.5 Pemeriksaan Preparat Histopatologi Paru

1. Preparat dilihat di bawah mikroskop cahaya pada perbesaran 100x untuk menentukan letak bronkiolus yang akan dibaca jumlah eosinofilnya
2. Menentukan tiga penampang bronkiolus yang akan diamati dan menghitung jumlah sel eosinofil di jaringan peribronkiolus pada perbesaran 400x
3. Menghitung jumlah sel eosinofil pada ketiga penampang bronkiolus di tiap preparat jaringan paru dan menjumlahkan eosinofil yang tampak
4. Tiap kelompok terdiri dari 6 mencit, dan dari tiap mencit dibuat 3 preparat jaringan paru maka pada tiap kelompok nantinya akan diperoleh 18 angka mengenai jumlah eosinofil bronkiolus
5. Menghitung rata-rata jumlah eosinofil tiap kelompok dari tiga kelompok dibandingkan satu sama lain secara statistik.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan komputer SPSS *for Windows*. Data tersebut dengan skala rasio dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Jika distribusi data normal dan varian data sama dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* kemudian jika terdapat perbedaan bermakna dilanjutkan dengan analisa *Post Hoc*. Jika distribusi data tidak normal dan atau varian data tidak sama dilakukan uji *Kruskal-Wallis*. Kemudian jika didapat $p < 0,05$, maka data tersebut diuji dengan uji *Mann Whitney Test* dengan ketentuan:

1. Jika $p \leq 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna.
2. Jika $p \geq 0,05$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna.

Jika didapatkan hasil yang berbeda bermakna maka ada perbedaan yang bermakna jumlah eosinofil pada paru mencit *Balb/c* usia 6-12 minggu pada pemberian suplemen vitamin D. Jika didapatkan hasil yang tidak berbeda makna, maka tidak ada perbedaan yang bermakna jumlah eosinofil pada paru mencit *Balb/c* usia 6-12 minggu pada pemberian suplemen vitamin D.

3.10 Etika Penelitian

Pelaksanaan penelitian akan dilakukan dengan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan RSUP dr. Kariadi Semarang.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 4. Jadwal Penelitian

Kegiatan	Bulan 1	Bulan 2	Bulan 3	Bulan 4	Bulan 5
Studi Literatur					
Penyusunan Proposal					
Seminar Proposal					
Persiapan Peminjaman Laboratorium					
Persiapan Bahan dan Alat					
Penelitian					
Analisis Data dan Evaluasi					
Penulisan Laporan					
Seminar Hasil					